Untersuchungen zur Transferrin–Untergruppen–Verteilung im Raum Düsseldorf

Inge Marie Pfeiffer

1981

Diss. Düsseldorf

UNIV.
LIBRARY
USL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0115

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Untersuchungen zur Transferrin–Untergruppen–Verteilung im Raum Düsseldorf

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Inge Marie Pfeiffer

1981

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. G. Arnold

Referent
gez.:
Prof. Dr. G. Röhrborn

Korreferent
gez.:
Prof. Dr. H. Schweitzer

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	
Untersuchungsmaterial	3
Isoelektrische Fokussierung	3
Behandlung der fokussierten Gele	4
Nachweis des Transferrins	5
Vertikale Gelelektrophorese	6
Statistische Auswertung	6
DIE HISTORISCHE ENTWICKLUNG DER ISOELEKTRISCHEN FOKUSSIERUNG	7
BESCHREIBUNG DES TRANSFERRIN-SYSTEMS	
Biochemische Eigenschaften	11
Gen-Häufigkeiten der Transferrin-Typen und deren geographische Verteilung	15
Chromosomale Zuordnung des Transferrin-Locus	19
Kongenitale Atransferrinämie	21
ERGEBNISSE	
Identifizierung der Transferrin-Banden	24

Darstellung des Transferrins aus Serum und EDTA-Plasma 28
Bestimmung der Transferrin-Typen 30
Einfluß von Elektrodenlösungen, Probenvolumina und Neuraminidase-Behandlung auf die Auftrennung der Transferrin-Banden 34
Genfrequenzen 38

DISKUSSION 39

ZUSAMMENFASSUNG 46

LITERATUR 47

REAGENZIEN 56

ANHANG 58

DANKSAGUNG 61

LEBENSLAUF 62

EINLEITUNG

Mit der zweidimensionalen Stärke-Gel-Elektrophorese untersuchte SMITHIES (1957) menschliches Serum von europiden Amerikanern. Er beobachtete, daß sich die ß-Globuline in vier Banden darstellten. Er bezeichnete sie mit ß-Globulin A, B, C und E und wies darauf hin, daß der C-Typ meist sehr stark ausgeprägt ist. Zufällig fand er im Serum einer negriden Amerikanerin zusätzlich zum ß-Globulin C eine Variante D, die sich durch eine etwas geringere elektrophoretische Wanderungsstrecke auszeichnete. Diese Variante konnte wiederholt bei schwarzen Amerikanern und bei Australiern beobachtet werden, jedoch nicht im Serum von Kanadiern. SMITHIES vermutete daher, daß das Vorkommen des D-Typs rassenbedingt sei und einer genetischen Kontrolle unterliege.

Die ß-Globuline C und D sowie eine zusätzlich gefundene Variante B konnten SMITHIES und HILLER (1959) durch folgende Erkenntnisse als Transferrin identifizieren:

- Bei der Filterpapier-Elektrophorese beobachtete LAURELL (1952), daß Transferrin wie ß-Globulin wandert.
- Die Wanderungsstrecken von gereinigtem, menschlichen Transferrin (aus Cohn'scher Fraktion IV-7 von gepooltem Plasma) und ß-Globulin C waren in der Stärke-Gel-Elektrophorese identisch, ihre Beeinträchtigung durch Diphterie-Toxine gleichsinnig (POULIK, 1956).
- Während der Stärke-Gel-Immunphorese reagierte ß-Globulin C spezifisch mit Antiserum, das in Kaninchen gegen menschliches Transferrin gebildet worden war (POULIK, 1958).
- Nachdem radioaktives Eisen (^{59}Fe) in geringen Mengen oral verabreicht oder dem Serum beigegeben war, erschien es ausschließlich an ß-Globulin C gebunden. Umgekehrt konnte markiertes Eisen im Serum vom Typ Transferrin CD (Tf CD) nach

UNIV. LEIDEN MED.

der Elektrophorese an ß-Globulin C und ß-Globulin D gebunden nachgewiesen werden (SMITHIES und HILLER, 1959).
Weiterführende Untersuchungen bezüglich unterschiedlicher Wanderungsstrecken der Transferrin-Banden ließen erkennen, daß sich die Transferrin-Varianten lediglich in einzelnen Aminosäureresten voneinander unterschieden (SMITHIES, 1959; WANG 1967). Familienuntersuchungen zeigten, daß der Polymorphismus des Transferrins auf einem autosomalen Genlocus mit multipler Allelie beruht (SMITHIES, 1959).
Um den Polymorphismus von Proteinen differenzierter untersuchen zu können, wurden zahlreiche Trennverfahren entwickelt. Eine in letzter Zeit häufig angewandte Methode ist die isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-Gelen. In unterschiedlichen pH-Bereichen, zum Beispiel zwischen pH 4,0 - 6,5, die über eine Strecke von ungefähr 10 cm gespreizt werden, lagern sich Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt (pI) in Banden an. Dort werden sie mit Hilfe der Immunfixation identifiziert. Mittels dieser Methode fanden KÜHNL und SPIELMANN (1978, 1979) einen Polymorphismus im Transferrin-C-System. In weiterführenden Fokussierungsversuchen auf selbst erstellten Dünnschichtgelen konnten zusätzliche Transferrin-C-Varianten in anderen Populationen gefunden werden (CONSTANS et al., 1980).
Um weitere Informationen über die Genotypen-Verteilung in der deutschen Bevölkerung zu gewinnen, sollte am hiesigen Institut die Methode der isoelektrischen Fokussierung des Transferrins etabliert und eine populationsgenetische Studie im Raum Düsseldorf durchgeführt werden.

MATERIAL UND METHODEN

Untersuchungsmaterial

Für unsere Fokussierungsversuche wurden EDTA-Plasma und Serum, sowohl frisch entnommene als auch bei -20°C bis -30°C gelagerte Proben nicht verwandter Blutspender aus dem Raum Düsseldorf verwendet.
Aus technischen Gründen erhielten wir von der Blutbank fast ausschließlich Serum von Spendern der Blutgruppe 0.
Zur Vermeidung von Bakterienwachstum wurden die Proben vor der Lagerung mit 10 µl 4 % NaN_3 je ml Serum versehen.
Vor einigen Versuchen wurden sowohl Serum als auch EDTA-Plasma mit Neuraminidase (Behring) 19 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (20 µl Serum, 10 µl Neuraminidase, 3 µl 4 % NaN_3). Einzelne Seren wurden mit 5 µg dreiwertiger Eisen-Ionen aus $NH_4Fe(SO_4)_2 x$ 6 H_2O je ml Serum 60 Minuten bei 37° inkubiert (modifiziert nach MUELLER et al., 1962 und KÖHNL, 1979). Die isoelektrische Fokussierung erfolgte auf einer Multiphor Fokussiereinheit (LKB). Als Kontaktflüssigkeit zwischen Gel und Kühlplatte wurde 40%ige Glyzerinlösung verwendet.

Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde bei einer Kühlwassertemperatur von 10°C durchgeführt.
Die Filterstreifen für die Elektrodenlösungen wurden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette gleichmäßig mit 2%iger Ampholine-Lösung getränkt, Anode: pH 4,0 - 6,0, Kathode: pH 6,0 - 8,0. Die Elektrodenlösungen wurden stets frisch unter sterilen Bedingungen aus den kommerziell erhältlichen 40%igen Stammlösungen (LKB) hergestellt.
Die Gele wurden eine halbe Stunde vorfokussiert (1800 V max.,

25 mA max., 20 W max.). Dabei stieg die Spannung von 180 V auf 600 - 800 V an, während sich die Stromstärke von 25 mA auf ungefähr 20 mA verringerte.
Die Filterplättchen für die Serumproben (5 x 7 mm, geschnitten aus Dünnschicht-Elektrophorese-Papierbrücken, Desaga) wurden so aufgelegt, daß der Abstand von der Kathodenkante des Gels bis zur Oberkante der Plättchen 3 cm betrug. Die Längskante der Plättchen lag dabei in Trennrichtung. Zur Vermeidung von Randeffekten sollten die Plättchen nicht zu nah an den linken und rechten Gelrand aufgelegt werden.
Es wurden jeweils 4 bzw. 5 µl Serum als Probe aufgetragen. Bei Seren, die mit Neuraminidase vorbehandelt worden waren, mußte die Probenmenge auf 7 µl erhöht werden.
Die Gele wurden 1,5 Stunden mit serumgetränkten Filterplättchen fokussiert. In dieser Zeit erhöhte sich die Spannung von 600 V auf 1300 V, die Stromstärke fiel auf 15 mA ab. Die Filterplättchen wurden dann entfernt und das Gel 3 Stunden weiterfokussiert. Zum Schluß wurde eine Spannung von 1500 V gemessen. Elektrodenflüssigkeit, die sich während der fünfstündigen Fokussierung vorwiegend an der Kathode angesammelt hatte, wurde in stündlichen Intervallen entfernt.
Eine derartige Flüssigkeitsansammlung bei Anwendung von Ampholine-Lösungen als Elektrodenlösung wurde auch von FAWCETT (1975) beschrieben.

Behandlung der fokussierten Gele

Die Denaturierung der fokussierten Proteine erfolgte über mindestens zwei Stunden in einer Fixierlösung aus 30 g Sulfosalizylsäure, 330 ml Methanol und 660 ml Aqua dest. (HOSTE, 1979). Die Färbelösung für die so fixierten Proteinbanden wurde nach Angabe der Herstellfirma angefertigt. Nach dem Fixieren wurden die Gele kurz mit Entfärbelösung abgespült und in der kalten Färbelösung

30 - 45 Minuten gefärbt. Für die Entfärbung benutzte ich unterschiedliche Lösungen. Entfärbelösung A für die ersten 3 - 4 Bäder (650 ml Aqua dest., 500 ml Methanol, 80 ml Eisessig), Entfärbelösung B für die folgenden Entfärbebäder (1340 ml Aqua dest., 500 ml Methanol und 160 ml Eisessig).
Die Gele wurden nach ausreichender Entfärbung eine Stunde lang in eine Konservierlösung (200 ml Entfärbelösung B, 200 ml Aqua dest., 40 ml Glycerin, 2,5 ml 4 % NaN_3) eingelegt und anschließend auf ebener Unterlage ungefähr 2 Stunden bei Raumtemperatur oberflächlich getrocknet. Nach Abdecken mit Kunststoffolie wurden die Kanten mit Tesa-Film versiegelt, um ein Austrocknen der Gele zu verhindern. Nach einjähriger Lagerung bei $4^{o}C$ konnten weder Pilzwachstum noch sonstige Veränderungen festgestellt werden.

Nachweis des Transferrins

Zur Identifizierung der Transferrin-Banden im Gel wurde nach der Fokussierung eine Immunfixation durchgeführt. Zellulose-Acetat-Folie (Membran-Filter, Sartorius) wurde hierzu mit Anti-Human-Transferrin-Serum getränkt und 2 Minuten von der Kathode zur Anode über das fokussierte Gel gelegt. Der Streifen mit den Antigen-Antikörper-Komplexen wurde über Nacht in Leitungswasser gespült, die Transferrin-Banden anschließend in 1%iger Coomassie Brilliant Blue Lösung angefärbt.
In Parallel-Versuchen wurde der Transferrin-Nachweis mit Nitroso R-Salz nach MUELLER und SMITHIES (1962) durchgeführt (spezifischer Färbenachweis für eisenbindende Proteine). Zu diesem Zweck wurden Serumproben vor dem Versuch mit 5 µg Fe^{3+} je ml versetzt. Nach Fokussierung und Anfärbung zeigten sich blaß-grünliche Banden der eisenbindenden Proteine im sonst farblosen Gel.

Vertikale Gelelektrophorese

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden alle Seren, die sich homozygot als Tf C1, C2 oder C3 dargestellt hatten, in der vertikalen Gelelektrophorese nachuntersucht. Diese Versuche wurden in einer Einrichtung nach Stegemann in 5%igen Acrylamid-Gelen durchgeführt. Ein Plattengel bestand aus 7,5 g Acrylamid, 0,375 g N,N'-Methylenbisacrylamid, Tris-Borat-Puffer pH 8,9 ad 150 ml. Zu 140 ml dieser Lösung wurde 50 mg Na-Sulfit, 0,1 ml TEMED und 58 mg Ammoniumperoxodisulfat gegeben. Die Auftrennung erfolgte in 70 Minuten bei 550 V und 1°C (SCHEIL, 1973). Die Gele wurden gefärbt in einer Lösung aus 3 g Trichloressigsäure, 400 ml Aqua dest., 100 ml Methanol, 35 ml Eisessig, 12,5 ml 1%ige Coomassie Brilliant Blue R-250 und entfärbt in 3500 ml Aqua dest., 1500 ml Methanol, 250 ml Eisessig.

Statistische Auswertung

Die Genfrequenz wurde mittels der Genzählmethode berechnet. Aus den Genfrequenzen wurden die Erwartungswerte der Phänotypen für die untersuchte Population errechnet und mit den beobachteten Werten mit Hilfe des χ^2-Testes verglichen (CROW und KIMURA, 1970). Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht (DRIESEL et al., 1981).

DIE HISTORISCHE ENTWICKLUNG DER ISOELEKTRISCHEN FOKUSSIERUNG

Der von SVENSSON (1961) verwirklichten Methode, Ionen in einem kontinuierlichen stabilen pH-Gradienten zu fokussieren, gingen viele Untersuchungen voraus.
Aus dem Jahr 1897 liegt eine Veröffentlichung von PICTON und LINDER über die "elektrische Konvektion bestimmter gelöster Substanzen" vor. Die Versuche wurden in einem Apparat durchgeführt, der Vorbild für alle später entwickelten Elektrophorese- und Fokussiersäulen sein könnte. Er bestand aus einem an beiden Enden geschlossenem, mit Elektroden beidseits versehenem Glasrohr mit einem Öffnungsstutzen auf halber Länge. Es ist denkbar, daß die Autoren, noch bevor amphotheres Verhalten beschrieben oder das pH-Konzept eingeführt worden war, unbewußt isoelektrische Fokussierung durchgeführt haben. Es wurde kein Dichtegradient benutzt. Bei der elektrolytischen Einwirkung auf eine Mischung von Farbstoffen beobachteten die Wissenschaftler, daß sich positive Farbstoffe an der Kathode, negative an der Anode konzentrierten. Weiterhin beobachteten sie nach verlängerter Stromeinwirkung eine Richtungsumkehr der zuvor eingeschlagenen Wanderungsrichtung bei einzelnen Farbstoffen wie Arsensulfid, Eisenhydroxyd und Hämoglobin. Dies könnte damit erklärt werden, daß durch verlängerte Elektrolyse ein pH-Gradient aufgebaut wurde, der eine Änderung der ursprünglichen Ladung amphotherer Stoffe und dadurch eine Umkehr der Wanderungsrichtung bewirkte.
Als die eigentlichen Initiatoren der isoelektrischen Fokussierung könnten WILLIAMS und WATERMANN bezeichnet werden. Sie beschrieben 1929 eine 14-Kammer-Anlage, in der sie mit Hilfe der Elektrolyse verschiedene sich in Lösung befindliche Substanzen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten voneinander trennen konnten. Die Elektrolyse erfolgte mit Platin-Gaze Elektroden und 110 V über 60 Stunden, wobei die Stromstärke von anfangs 40 mA auf 13 mA sank. Die Kammern des Elektrolysegerätes waren durch

Pergamentpapiermembranen voneinander getrennt. Nach dem Versuch wurden die pH-Werte der einzelnen Kammern gemessen, die zwischen pH 8,6 und 2,8 lagen, die jeweils darin enthaltenen Substanzen extrahiert und ihre Konzentration bestimmt. Die Autoren betonten den besonderen Nutzen dieser Methode für die Auftrennung von Ampholyten, deren maximale Konzentration im Bereich ihrer isoelektrischen Punkte zu erwarten sei.
Unabhängig von dieser Arbeit beschrieb TISELIUS (1941) einen ähnlichen Versuchsaufbau mit 10 Kammern. Er zeigte, daß mit Hilfe der verlängerten Elektrolyse einer Ampholytlösung der Aufbau eines stabilen "steady-state" ph-Gradienten auf einem Gleichgewicht zwischen Diffusion und Elektromigration beruhe. SVENSSON bezeichnete später diesen pH-Gradienten als "natürlichen pH-Gradienten", der durch den elektrischen Strom selbst, durch seine elektrolytische Wirkung auf alle Elektrolyte, sowohl auf Salze als auch auf Ampholyte aufgebaut wird.
Einen neuen Anstoß bekam die isoelektrische Fokussierung in den Jahren 1953 - 55 durch die Arbeiten von KOLIN. In einer vertikalen Säule zeigte er die Auftrennung der Bestandteile einer Suspension oder einer Lösung und bezeichnete die Bandenbildung als "isoelektrisches Spektrum". In seiner Methode kombinierte er pH-, Leitfähigkeits- und Dichtegradienten und zeigte innerhalb von vier Minuten bei 100 V und 13 mA den Aufbau eines sogenannten "künstlichen oder vorgegebenen pH-Gradienten", in welchem Proteine durch Wanderung zu ihren isoelektrischen Punkten voneinander getrennt werden konnten. Diese künstlichen pH-Gradienten waren nicht sehr stabil, sie drifteten unter der Einwirkung des elektrischen Stromes, die Banden waren oft unscharf und die Proteine lagen nicht genau in den Regionen ihres isoelektrischen Punktes.
Die Untersuchungsmethoden KOLINS wurden 1956 von TUTTLE modifiziert. In einem hierzu konstruierten Apparat konnten in vier Röhren nebeneinander unterschiedliche Hämoglobintypen nach 35 Minuten und 200 V zu scharfen Banden fokussiert werden. Neben-

einander untersuchte identische Hämoglobine führten zu identischer Bandenbildung in gleicher Höhe der vier Röhren, was zur Bestimmung unbekannter Hämoglobinlösungen dienen konnte. TUTTLE (1956) wies darauf hin, daß nicht nur die angelegte Spannung, sondern in hohem Maße auch die Konzentration der Proteine in der Untersuchungslösung einen Einfluß auf die Schärfe der Banden ausübe. Er beschrieb, daß bei unveränderten pH-Werten der Elektrodenpuffer die Neigung des pH-Gradienten hauptsächlich durch die Entfernung zwischen anodischem und kathodischem Puffer, also durch die Menge der Untersuchungslösung bestimmt wurde. Bei größeren Differenzen der isoelektrischen Punkte von Proteinen, die untersucht werden sollten, genügte eine geringe Probenmenge, die zwischen die Puffer gebracht wurde, woraus ein stufenförmiger pH-Gradient resultierte. Sollten Proteine mit nur geringfügig voneinander abweichenden isoelektrischen Punkten untersucht werden, war es notwendig, das Volumen der Untersuchungslösungen u. U. zu vervielfachen. So wurde der enge pH-Bereich gespreizt und die Banden mit größerem Abstand voneinander fokussiert.

SVENSSON (1962) kombinierte verschiedene vorher bekannte und verwendete Trennungsverfahren und stellte seinen "Apparat für die Elektrolyse in Säulen, stabilisiert durch Dichtegradienten" vor. Er zeigte, daß die isoelektrische Auftrennung von Proteinen in einem pH-Gradienten nur erfolgreich in Gegenwart von Trägerampholyten durchgeführt werden kann. Trägerampholyte sind niedermolekulare Substanzen, deren isoelektrischer Punkt zwischen zwei nahe gelegenen pK-Werten liegt. Diese Ampholyte besitzen beachtenswerte Pufferfähigkeiten im isolektrischen Zustand und ermöglichen den Aufbau eines gleichmäßigen linearen pH-Gradienten, wenn sie in ausreichender Anzahl und isoelektrischen Punkten, die über die gesamte pH-Skala gestreut sind, zur Verfügung stehen.

SVENSSON benutzte zunächst als Trägerampholyte unter anderem Histidin, Histidyl-Histidin, ß-Alanin, Glycin, Histidinchlorid, die sich zur Untersuchung von Proteinen mit einem pI im neutralen Bereich eigneten. Für andere pH-Regionen war die Auswahl geeigneter Ampholyte begrenzt.
VESTERBERGs Entwicklung einer Methode, geeignete Träger-Ampholyte synthetisch herzustellen, beseitigte seit 1964 diesen Engpaß und verhalf der isoelektrischen Fokussierung als einem empfindlichen Trennverfahren zu allgemeiner Anerkennung und Anwendung.
Das zunächst sehr aufwendige Verfahren der Fokussierung in Säulen über 36 - 48 Stunden (VESTERBERG et al., 1967) wurde verbessert durch WRIGLEYs (1968) Vorschlag, als Trägermaterial Polyacrylamid-Flachgele zu verwenden. Hierauf konnten mehrere Serumproben gleichzeitig in der relativ kurzen Zeit von 3 - 5 Stunden aufgetrennt werden. Das vereinfachte Ausmessen des pH-Gradienten und damit verbunden die exakte Bestimmung des isoelektrischen Punktes der untersuchten Proteine war ein entscheidender Vorteil.

BESCHREIBUNG DES TRANSFERRIN-SYTEMS

Biochemische Eigenschaften des Transferrins

Transferrin ist ein metallbindendes Serumprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 77000, das aus einer einfachen Polypeptidkette besteht (MANN et al., 1970). Sein mittlerer Plasmaspiegel beträgt etwa 300 mg/100 ml, das entspricht 4,5 % der Plasmaproteine. Es dient dem Transport des Eisens aus den Resorptions- und Speicherorganen zu den Blutbildungsstätten. Außerdem wird Eisen in geringen Mengen in der Muskulatur und für eisenhaltige Fermente benötigt. Im Transferrin liegt das Eisen in dreiwertiger Form als Fe^{3+} vor. Versuche von AISEN (1967, 1969), HOPKINS und SCHWARZ (1964) und JONES und PERKINS (1965) zeigten, daß Transferrin eine große Zahl anderer Metallionen binden kann. Lange Zeit wurde angenommen, daß die Metallbindungsstellen identisch seien und sich nicht beeinflußten. LUK (1971) untersuchte die Bindungsfähigkeit des Transferrins für seltene Erden, die durch ihre charakteristischen Absorptionsspektren in den Verbindungen, die sie eingehen, besonders gut nachgewiesen werden können. Er beobachtete jeweils zwei Bindungsstellen für dreiwertige Terbium-, Europium-, Erbium- und Holmium-Ionen, es wurden jedoch Neodym und Praseodym nur an einer Bindungsstelle angelagert. Diese Beobachtung erklärte LUK mit den relativ großen Ionenradien von Nd^{3+} und Pr^{3+} und schloß auf eine unterschiedliche Größe der Metallbindungsstellen im Transferrinmolekül. Die Bindung des Eisenions an Transferrin kann nur in Gegenwart eines synergistisch wirkenden Anions erfolgen. Dies können Oxalat-, Malonat- und andere Ionen sein, von physiologischer Bedeutung ist jedoch hauptsächlich der außerordentlich feste Eisen-Bicarbonat-Transferrin-Komplex. Im Milieu des Blutes wird er von hydrolytischen Reaktionen nicht be-

einflußt, die sonst zu unlöslichen Eisenhydroxydverbindungen führen würden. Bicarbonat scheint brückenbildend die Bindung des Eisens an das Protein zu stabilisieren. Es ist jedoch austauschbar gegen freies, in Lösung befindliches Bicarbonat und ist eventuell der erste Angriffspunkt bei der Freigabe von Eisen an die Retikulozyten (AISEN, 1976). Zu diesem Zweck lagert sich das Transferrinmolekül an spezifische Rezeptoren der Retikulozytenmembran an. Diese Identifizierungsmöglichkeit orientiert sich jedoch nicht an den Eisenbindungsstellen des Transferrinmoleküls (SPEYER, 1974). Innerhalb der Retikulozyten besorgen Transportproteine die Aufnahme und Weiterleitung des Eisens, das von hier aus in das Hämoglobin der jugendlichen Erythrozyten eingebaut wird. Die tägliche Hämoglobinsynthese benötigt eine Bereitstellung von 25 - 30 mg Eisen. Das Plasma eines Erwachsenen enthält ca. 9 g Transferrin, welches bei vollständiger Sättigung 11 - 12 mg Eisen transportieren könnte. Es zirkuliert normalerweise aber nur zu einem Drittel gesättigt und muß täglich zehnmal umgesetzt werden, um ein ausreichendes Eisenangebot in den Blutbildungsstätten zu gewährleisten. Bei Eisenmangel wird eine reaktive Erhöhung des Transferrin-Spiegels beobachtet.

VAN DER HEUL (1972) zeigte in Untersuchungen über die Eisenbindungsfähigkeit des Transferrins, daß bei einer Fe-Sättigung, die 30 % übersteigt, Eisen auch von anderen Plasmaproteinen gebunden wird. Die totale Eisen-Bindungskapazität (TIBC) des Plasmas gibt demnach das Bindungsvermögen sämtlicher eisenbindender Proteine an. Hierzu gehören hauptsächlich das Albumin, das mit den α_2-Globulinen wandernde Coeruloplasmin, Ferritin, ein eisenspeicherndes Protein, außerdem α_1- und y-Globuline. Es sollten deshalb nur spezifische immunchemische Untersuchungen zur Ermittlung der TIBC des Transferrins herangezogen werden.

Je nach Sättigungsgrad kommt das Transferrin in drei Zustandsformen im Organismus vor.

Zustandsform	pI
Apotransferrin, eisenfrei	5,9 - 6,2
Tf - 1Fe, 1 Fe^{3+} angelagert	5,5 - 5,7
Tf - 2Fe, 2 Fe^{3+} angelagert	um 5,2

(KÖHNL und SPIELMANN 1979; HOVANESSIAN, 1976)

Untersuchungen über die Einwirkung des pH auf die Freisetzung von Eisen zeigten, daß die beiden Bindungsstellen im Transferrin-Molekül unterschiedlich starke Bindungen mit Fe^{3+} eingehen. LESTAS (1976) untersuchte den Zusammenhang zwischen der Freigabe von Eisen aus seiner Bindung an Transferrin und dem pH-Wert der Lösung. Er beobachtete eine doppelt sigmoidale Dissoziationskurve bei einer Senkung des pH von 7,5 auf 5,0 und vermutete, daß zwei unterschiedliche Bindungsstellen nacheinander bei fortschreitender Reduktion des pH angegriffen werden. Durch die Senkung des pH von 7,5 auf 5,7 löste sich Eisen aus einer schwächeren Bindungsstelle A, um sich an einer festeren Bindungsstelle B von Apotransferrin anzulagern. Bei 50%iger Eisensättigung waren alle Eisen-Ionen als Tf - 1Fe - B Komplex fest gebunden.
MAKEY und SEAL (1976) bestätigten in ihren Untersuchungen das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Tf - 1Fe Komplexe. Sie wiesen in elektrophoretischer Auftrennung unterschiedlich gesättigter Transferrin-Lösungen vier molekulare Formen des Transferrins nach, die sich in vier Banden ablagerten:

Apotransferrin als eisenfreies Transferrin
Tf - 1Fe (A) mit 1 Fe^{3+} an der Bindungsstelle A
Tf - 1Fe (B) mit 1 Fe^{3+} an der Bindungsstelle B
Tf - 2Fe mit 2 Fe^{3+} an beiden Bindungsstellen

Durch diese Ergebnisse können die Beobachtungen von FLETCHER und HUEHNS (1968) erklärt werden, die die Eisenaufnahme der Retikulozyten in vitro bei physiologischem pH untersuchten. Nach ihren Beschreibungen nahmen die Retikulozyten Eisen aus Tf - 2Fe Molekülen zehnmal leichter auf als aus Tf - 1Fe Molekülen. Sie beobachteten ferner, daß Fe^{3+} aus einer der Bindungsstellen bevorzugt aufgenommen wird gegenüber Fe^{3+} der anderen Bindungsstelle. Sie versuchten dies mit unterschiedlichen Strukturen in der Nachbarschaft der Bindungsstellen zu erklären und diskutierten auch eine allosterische Veränderung des Transferrin-Moleküls bei unterschiedlicher Eisensättigung. Mit Hilfe der Ionen-Austausch-Chromatographie konnte LANE (1975) ebenfalls zwei unterschiedliche Molekülformen für das Tf - 1Fe nachweisen. Auch er versuchte das unterschiedliche Verhalten der Bindungsstellen durch Konformationsänderung des Transferrin-Moleküls bei der Eisenbindung zu erklären (siehe auch CHARLWOOD, 1971 und TAN, 1971). Gleichzeitig beobachtete er, daß sich charakteristische Transferrin-Banden durch den Verlust eines Sialinsäurerestes bei der Ionen-Austausch-Chromatographie verändern.

Das Transferrin enthält je Molekül vier (POULIK, 1961; PARKER und BEARN, 1962) oder fünf (HAMANN, 1977) Sialinsäurereste, die glykosidisch an Kohlenhydratresten gebunden sind. Sialinsäuren sind starke Säuren und tragen entscheidend zur Ladung von Proteinen bei, womit sie die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld beeinflussen. Die Neuraminidase, ein Enzym, das aus Vibrio comma (cholerae), Clostridium perfringens, Arthrobacter ureafaciens und anderen gewonnen wird, spaltet Sialinsäure (Neuraminsäure) hydrolytisch ab. HAMANN konnte 1977 durch Neuraminidase-Behandlung 6 verschiedene Varianten des Transferrins anhand ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte nachweisen, Tf N5, N4,

N3, N2, N1 und Asialotransferrin.
Verschiedene Untersucher machten sich die veränderten Ladungsverhältnisse des Transferrins nach schrittweiser Abspaltung der Sialinsäurereste mit Hilfe steigender Konzentration von Neuraminidase und die schärfere Bandenbildung, die sie beobachtet hatten, für die Elektrophorese und die isoelektrische Fokussierung zunutze (HAMANN, 1977; HOVANESSIAN und AWDEH, 1976; KÖHNL und SPIELMANN, 1979; WONG et al., 1978).

Gen-Häufigkeiten der Transferrin-Typen und deren geographische Verteilung

Seit den Untersuchungen von SMITHIES (1957) ist die Erblichkeit der verschiedenen Transferrin-Typen bekannt und durch Familienuntersuchungen immer wieder bestätigt worden.
Tf^C wird in allen Populationen als das häufigste Gen mit einer Frequenz zwischen 0,6763 und 1,000 nachgewiesen. Neben diesem häufigen Gen sind die seltenen Allele des Tf^B und Tf^D schon lange bekannt. Einzelne Phänotypen konnten nur in einer Familie beobachtet werden, nach deren Namen oder Wohnort sie dann benannt wurden, z.B. $TfB_{Atalanti}$ oder TfD_{Wigan}.
Insgesamt sind inzwischen 27 (mit dem noch nicht identifizierten TfD_{NGS} von FERREL (1977) eventuell 28) Transferrin-Varianten beschrieben worden.
Wie in Abb. 1a zu sehen ist, kommt Tf^D vereinzelt in allen Populationen vor. Häufiger wird es bei Bewohnern tropischer Klimazonen und mit einer Frequenz von 0,091 - 0,1700 in Australien und Ozeanien beobachtet. In einer Bevölkerungsgruppe in Südaustralien wurde eine Genfrequenz für Tf^D von

0,3200 errechnet (KIRK, 1965). Bei Negriden in USA konnte eine Tf^D-Frequenz von 0,0489, bei Bewohnern Mittel-Amerikas (Indianiden) von 0,1111 festgestellt werden. Der Typ Tf^D Chi wird in verschiedenen Populationen beobachtet, bei Chinesen, Japanern, auf den Philippinischen Inseln, bei Bewohnern Sibiriens, bei Lappen, bei indianider Bevölkerung in Mexico, Mittel-Amerika und im Amazonas-Gebiet (Genfrequenzen nach MOURANT (1976) sind im Anhang aufgeführt).
Die Abb. 1b zeigt die geographische Verteilung der Häufigkeit für das Gen Tf^B. Die Varianten dieses Typs kommen insgesamt seltener vor als Tf^D. Nur sehr vereinzelt werden sie bei Afrikanern und Asiaten beobachtet. In der Bevölkerung Europas wurde für Tf^B eine durchschnittliche Frequenz von 0,0074 mit einer Variationsbreite von 0,0000 - 0,0156 festgestellt. Den zuletzt genannten Wert ermittelte PROCHNICKA (1968) bei der Untersuchung von 1119 Polen. Häufiger und regelmäßig kommt Tf^B bei Indianiden vor mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,0319. In Ozeanien konnte eine Genfrequenz von 0,0078 berechnet werden (Genfrequenzen nach MOURANT (1976) sind im Anhang aufgeführt).

Abb. 1a: Häufigkeiten des Gens TF^D bei einigen Bevölkerungen der Welt. Dargestellt sind nur Populationen mit Genfrequenzen größer als 0,005 (ohne weitere Differenzierung der verschiedenen D-Typen).

Genfrequenzen nach MOURANT, 1976

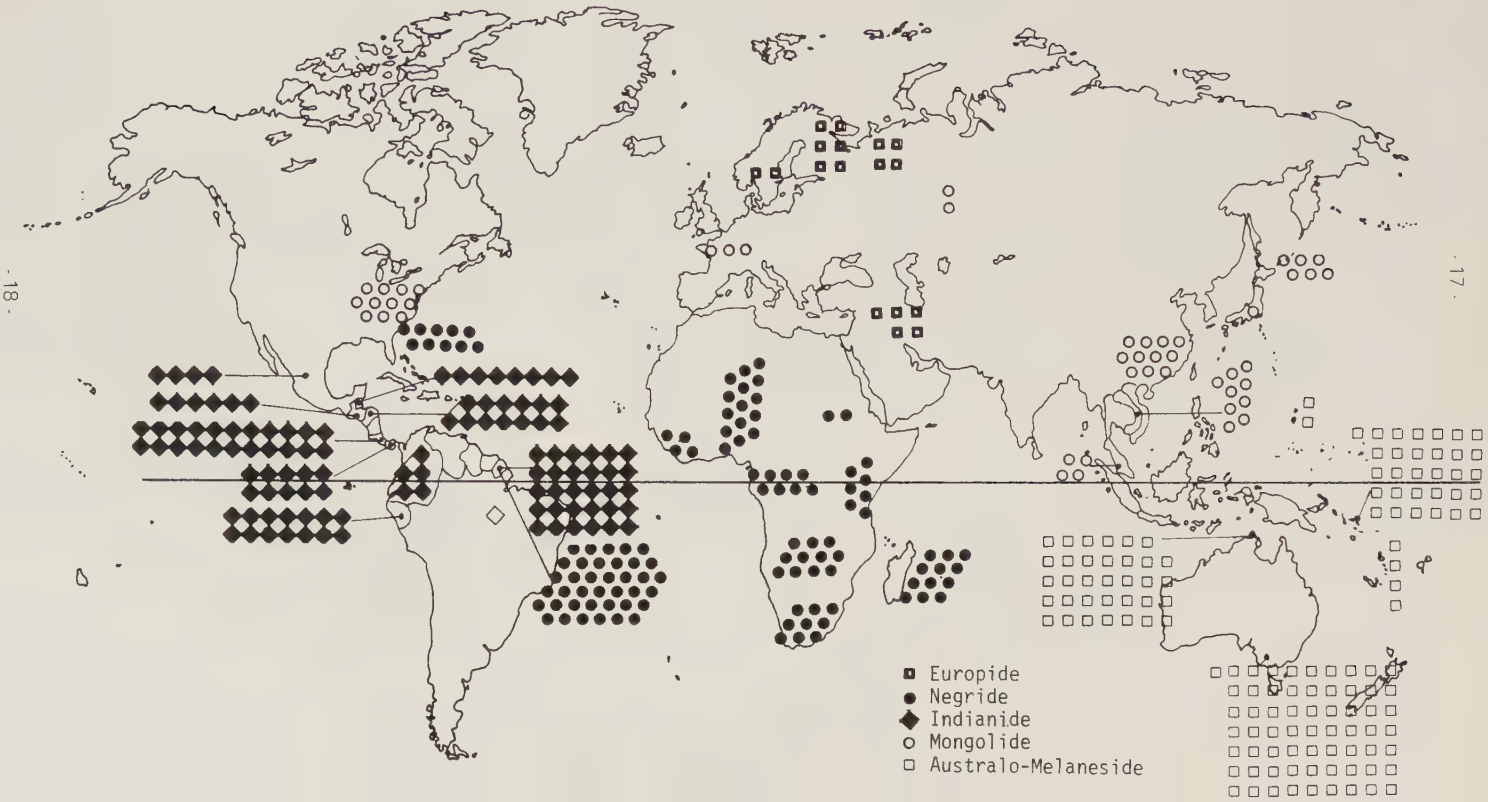
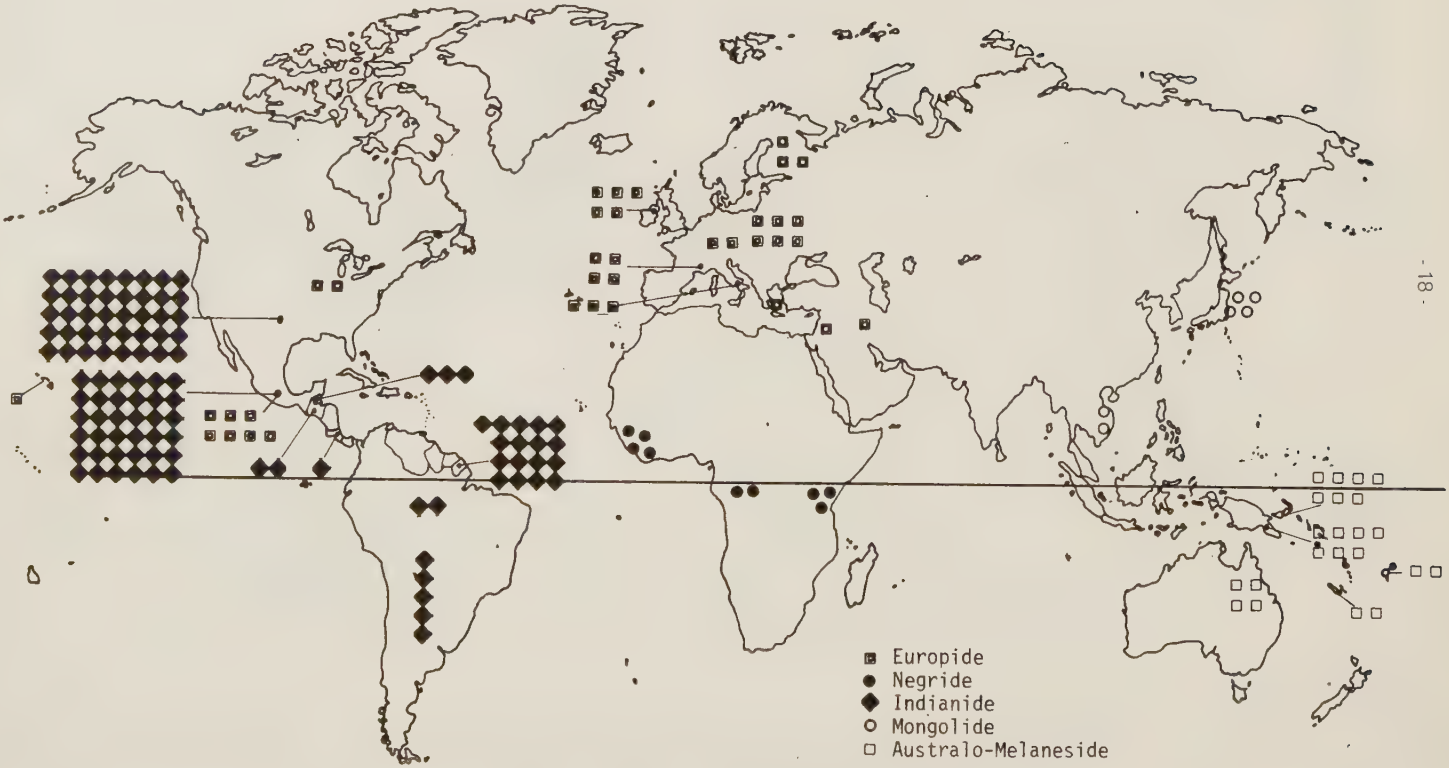


Abb. 1b: Häufigkeiten des Gens Tf^B bei einigen Bevölkerungen der Welt. Dargestellt sind nur Populationen mit Genfrequenzen größer als 0,0025 (ohne weitere Differenzierung der verschiedenen B-Typen).
Genfrequenzen nach MOURANT, 1976



Chromosomale Zuordnung des Transferrin-Locus

Da ich für meine Untersuchungen fast ausschließlich Seren der Blutgruppe O einsetzen konnte, stellte sich die Frage, ob dieses Kollektiv geeignet war für eine gültige populationsgenetische Untersuchung.
Das Transferrin-Gen ist nach McKUSICK (1978) auf Chromosom 1 lokalisiert (vgl. Abb. 2), während sich der Genort für das ABO-System auf Chromosom 9 befindet und damit eine Genkopplung ausgeschlossen sein kann.
Inzwischen wurden an Stammbaumuntersuchungen jedoch Genkopplungen des Genortes für Transferrin mit den ebenfalls auf Chromosom 1 lokalisierten Gen-Loci anderer Serumprotein-Systeme festgestellt. Bei einer Auswertung verschiedener Veröffentlichungen zu dieser Fragestellung ermittelte CHAUTARD-FREIRE-MAIA 1977 folgende mögliche Kopplungs-Reihenfolge der Genorte auf Chromosom 1: Tf - E_1 - PGD - Rh - PGM_1. Dagegen sind für andere Blutgruppensysteme wie MN, P, Kidd, Hp, Gc, Gm, ebenso für Duffy keine Hinweise auf Genkopplungen gefunden worden (CORCORAN et al., 1966; SEPPÄLA et al., 1967; UMANSKY et al., 1966).

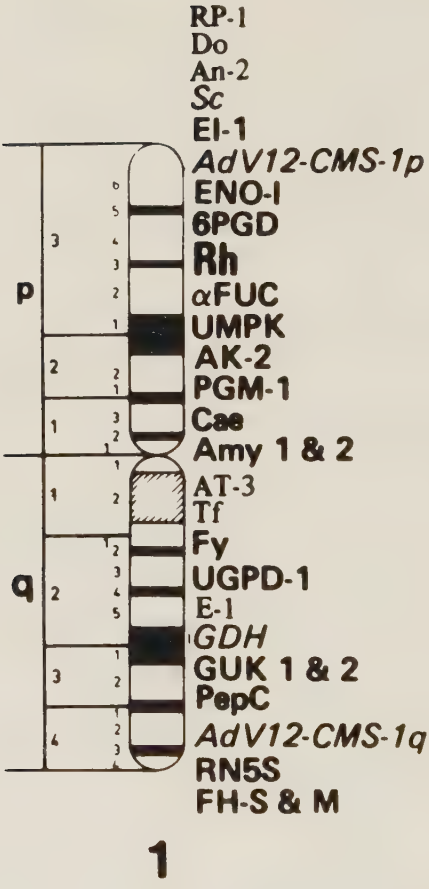


Abb. 2: Genkarte des Chromosoms 1
(aus McKUSICK, 1978)

Der Pfeil weist auf den Genort des Transferrins hin.

Kongenitale Atransferrinämie

Krankhafte Zustände beeinflussen in unterschiedlicher Weise den Transferrin-Spiegel des Plasmas. Hypertransferrinämie wird bei Eisenmangel, in der Schwangerschaft und im Säuglingsalter beobachtet.
Hypotransferrinämie ist eine Begleiterscheinung bei Infektionskrankheiten, Kollagenkrankheiten, Malignen Tumoren, Verbrennungskrankheit, Hämolytischer Anämie und Hypoproteinämie.
In sehr seltenen Fällen wurde eine kongenitale Atransferrinämie beobachtet, die in einer Eisenmangelanämie zum Ausdruck kam.
Die klinischen Symptome einer Anämie sind Blässe, Müdigkeit, Leistungsabfall, retardiertes Wachstum, Hohlnägel, eventuell Haarausfall, Infektanfälligkeit und anderes mehr.
Wenn nach Auswertung des Blutbildes, dem Befund eines erniedrigten Serumeisen-Spiegels und reduziertem Hb-Gehalt der Erythrozyten eine Eisenmangelanämie diagnostiziert wurde, findet man normalerweise reaktiv den Transferrin-Spiegel im Serum erhöht. Die Substitution der fehlenden Faktoren (wie Eisenpräparate, Vit. B_{12}, Folsäure) führt bald zur Erholung des Patienten.
HEILMEYER et al. (1961) beschrieben die Krankheitsgeschichte eines 7jährigen Kindes mit kongenitaler Atransferrinämie. Diese wurde in Form einer schweren Anämie im Alter von 3 Monaten entdeckt. Da keinerlei Reaktion auf Eisen-, Cortison- und Vitamin B_{12}-Gaben erfolgte, wurde alle drei Monate eine Bluttransfusion durchgeführt. Man stellte eine sehr niedrige Serumeisen-Konzentration, eine ungesättigte Eisenbindungskapazität und das Fehlen von Hämosiderin im Knochenmark fest. Die Plasma-Clearance-Rate von markiertem Eisen war starkt beschleunigt

(T 1/2 5 Minuten, normal 80 - 120 Minuten), zeigte hohe Radioaktivität über der Leber und nur sehr geringe Eisenutilisation im Knochenmark. Bei der elektrophoretischen Untersuchung des Patientenserums wurde keine Radioaktivität in der Region der ß-Globuline registriert. Der Serum-Transferrin-Spiegel des Kindes betrug 2 - 4 mg/100 ml (normal 200 - 400 mg/100 ml). Der Transferrin-Spiegel der Eltern war erniedrigt, sie litten jedoch nicht an einer Anämie. Das Kind starb plötzlich an Herzversagen. Der Tod war durch schwere Herzmuskelschädigung infolge exzessiver Eiseneinlagerung hervorgerufen. Leber, Milz und Pankreas waren ebenfalls von starker Siderose befallen.
Ein weiterer Fall wurde von GOYA et al., (1972) beschrieben. Ein Junge schien bis zu seinem siebten Lebensjahr unauffällig gewesen zu sein, wurde dann zusehends blasser und in ärztliche Behandlung gebracht. Untersuchungen ergaben neben einem pathologischen Blutbild einen Hämatokrit von 28,5 (normal 42 - 52), erniedrigten Serumeisen-Spiegel von 12 µg/100 ml (normal 80 - 140 µg/100 ml), gesenkte Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten von 20 pg (normal 27 - 31 pg). Die Plasma-Eisen-Clearance war mit T 1/2 = 25 Minuten stark beschleunigt. Der Transferrin-Spiegel des Patienten betrug 3 mg/100 ml oder weniger, bei drei Geschwistern 12, 14, 135 mg/100 ml und bei den Eltern 80 und 106 mg/100 ml. Nachdem eine Atransferrinämie diagnostiziert werden konnte, wurde ein eisenfreies Humantransferrin-Präparat transfundiert. Nach einer Woche konnte ein Anstieg der Hämoglobinsynthese beobachtet werden. Nach wiederholten Transferringaben erholten sich die Blutwerte des Patienten bis zur unteren Norm. Die Halbwertszeit für die Transferrin-Verweildauer im Organismus lag im normalen Bereich zwischen 6,9 - 8 Tagen. Die Autoren sahen den Vorteil einer Substitution von gereinigtem

Human-Transferrin darin, daß auf Eisengaben und Serum-Transfusionen mit ihren Nebenwirkungen verzichtet werden konnte. Sie beobachteten trotz der Heterogenität des Präparates in dem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten keine Antikörperbildung oder andere Nebenwirkungen.

ERGEBNISSE

Identifizierung der Transferrin-Banden nach der isoelektrischen Fokussierung

Die Identifizierung des Serum-Transferrins erfolgte nach der isoelektrischen Fokussierung mittels Immunfixation. Wie in Abb. 3 zu erkennen ist, zeigten sich dabei mehrere Reaktionsbanden aus Antigen-Antikörper-Komplexen, um ph 5,2, um pH 5,5 - 5,6, um pH 5,9 und um pH 6,0 - 6,2. Im Vergleich hierzu konnten unter den im Gel fokussierten und gefärbten Proteinen lediglich scharfe Banden im Bereich um pH 5,5 - 5,6 und pH 6,0 - 6,2 festgestellt werden, bei denen es sich nach KÖHNL und SPIELMANN (1979) um die Banden des Tf - 1Fe und die des Apotransferrins handelt.

Um den ungefähren pH-Wert der fokussierten Transferrin-Banden zu ermitteln, wurde während des Versuchs der Aufbau des pH-Gradienten im Gel beobachtet.

In Abb. 4a ist zu erkennen, daß sich nach 30 Minuten Vorfokussierung im mittleren Teil des Gels ein Plateau mit dem pH-Bereich 5,2 - 5,5 gebildet hatte. Im anodischen und kathodischen Bereich des Gels wurde bereits der Aufbau eines pH-Gradienten erkennbar. Dieser hatte sich nach 2 1/2stündiger Fokussierung linear über die gesamte Gelbreite ausgebildet und sich bis zum Abschluß des Versuchs lediglich hinsichtlich seiner Steigung noch verändert. Eine Drift des pH-Gradienten in kathodische Richtung, wie sie von FAWCETT (1975) für die verlängerte Fokussierung beschrieben worden war, konnte während der 5stündigen Versuchszeit nicht festgestellt werden.

Die Abb. 4b zeigt einen Ausschnitt aus dem fokussierten, mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbten Gel, die Position der Filterplättchen für die Aufgabe der Serum-Proben und den pH-Gradienten, der nach Abschluß der Fokussierung in diesem Gelbereich gemessen worden war.

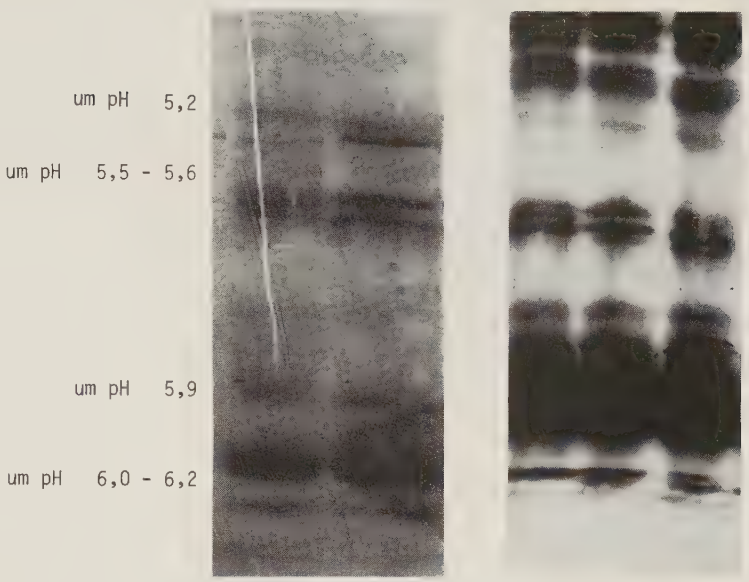
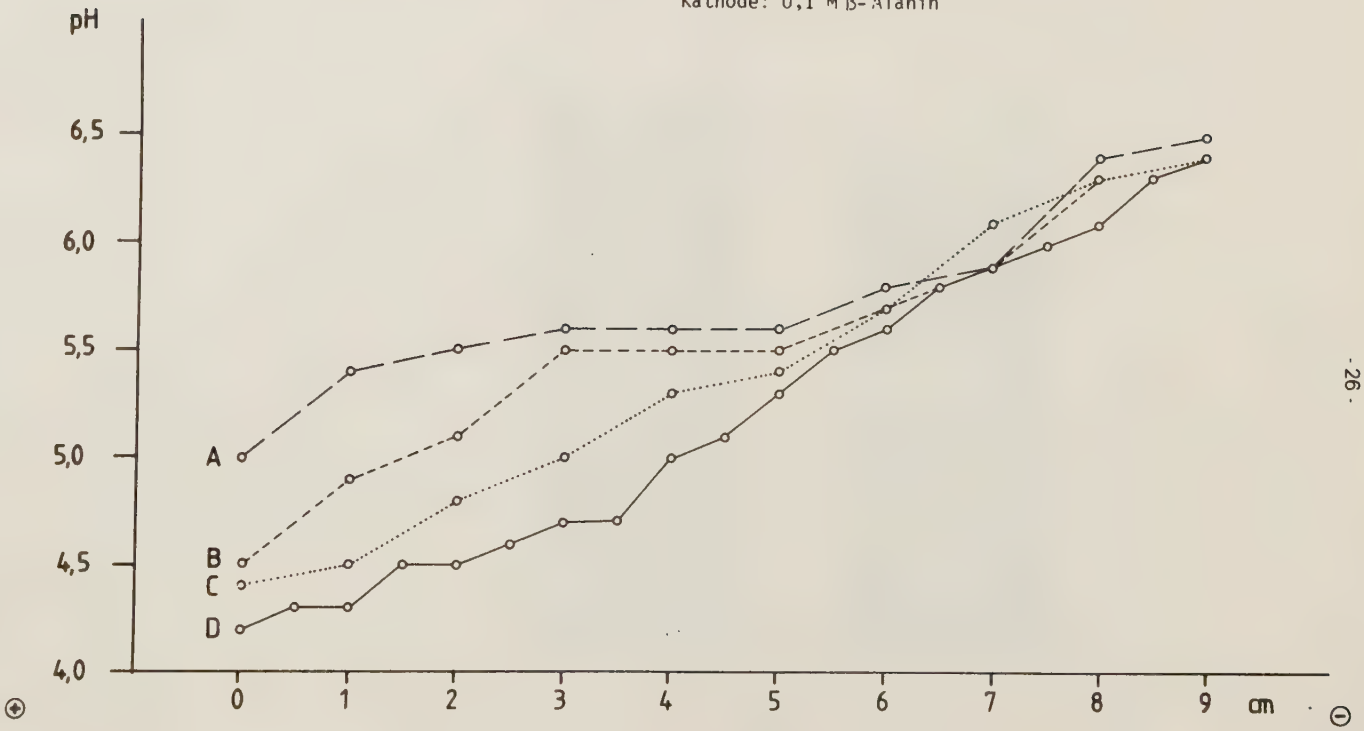


Abb.3: Transferrinbanden im fokussierten Gel bei Nachweis durch Immunfixation (a) und Coomassie Brilliant Blue Färbung (b)

Abb. 4a: Aufbau des pH-Gradienten in 0,1 cm PAG plates
während eines 3 1/2 stündigen Fokussiervorganges
Elektrodenlösungen: Anode 0,1 M Glutaminsäure
0,5 M Phosphorsäure
Kathode: 0,1 M β-Alanin



A: pH-Gradient nach 30 Min. Vorfokussierung
B: pH-Gradient nach 60 Min. Fokussierung
C: pH-Gradient nach 150 Min. Fokussierung
D: pH-Gradient nach 210 Min. Fokussierung

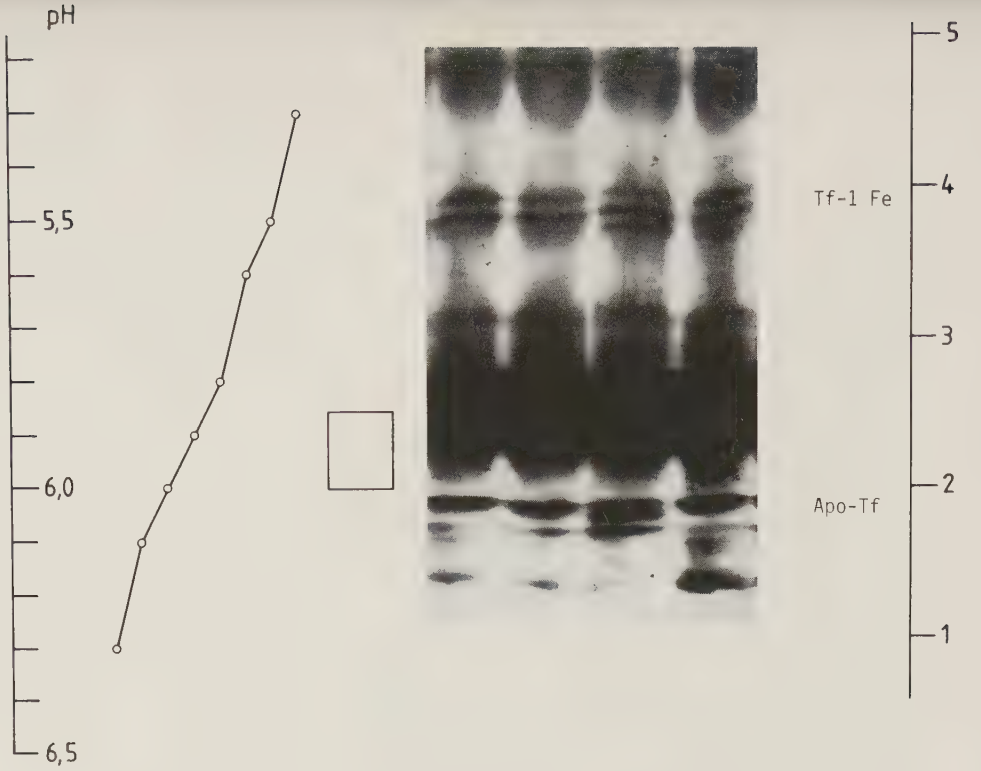


Abb. 4b: Der pH-Gradient im Gel nach der Fokussierung und die Lage der Transferrin-Banden (vergrößerter Ausschnitt)

Transferrin-Typen von links nach rechts
C1, C1, C2-1, C1

Darstellung des Transferrins aus Serum und EDTA-Plasma

Eine deutliche Bandenbildung konnte nur durch Fokussierung von Serum erhalten werden. Untersuchungen mit EDTA-Plasma zeigten im Bereich pH 5,5 - 5,6 diffuse Zonen, die auch durch Konzentrationsänderung nicht schärfer dargestellt werden konnten. Im Bereich pH 6,0 - 6,3 wurden multiple Banden sichtbar. Eine Zuordnung zu einem Transferrin-Phänotypen war bei fokussiertem EDTA-Plasma nicht möglich. Eine vergleichende Immunfixation von Serum und EDTA-Plasma ließ bei fokussiertem Serum die bereits bekannten vier Reaktionsbereiche erkennen. Immunpräzipitate des Tranferrins aus EDTA-Plasma konnten jedoch nur im kathodischen Fokussierungsbereich beobachtet werden, um pH 5,9, um pH 6,0, um pH 6,2 und um pH 6,3.

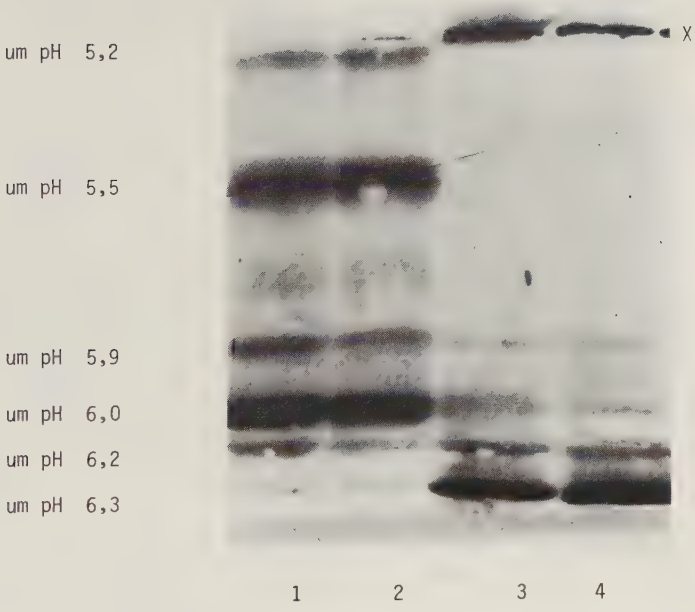


Abb. 5: Darstellung des Transferrins mittels Immunfixation
1 und 2: Serum
3 und 4: EDTA-Plasma
X: Plättchenartefakt

Bestimmung der Transferrin-Typen (Abb. 6 und 7)

Eine exakte Bestimmung der Transferrin-Phänotypen war nur dann möglich, wenn beide Bandenbereiche, die des Tf - 1Fe um pH 5,5 - 5,6 und die des Apotransferrins um pH 6,0 - 6,2 vergleichend abgelesen werden konnten. Viele der Tf C1 Seren zeigten im Tf - 1Fe Bereich drei beinahe gleichmäßig stark ausgeprägte Banden ähnlich wie Tf C2-1. Die sichere Zuordnung war dann durch die einzige Bande des Apotransferrins C1 möglich. Klar und deutlich stellten sich die Typen Tf C3-1, C3 und C2 dar und konnten leicht im Tf - 1Fe Bereich abgelesen werden. Tf C3-2 zeigte bei optimaler Serum-Konzentration vier charakteristische Banden im Tf - 1Fe Bereich. Diese stellten sich manchmal etwas verwischt dar, in solchen Fällen gelang eine sichere Zuordnung mit Hilfe der Apotransferrin-Doppelbanden, von denen die weiter zur Kathode gelegene immer stärker ausgeprägt war.
Bei einer Serumprobe konnten im erwarteten Fokussierungsbereich keine Transferrin-Banden festgestellt werden (vgl. Abb. 7: Bahn 7). Dieses Serum wurde mit Hilfe der vertikalen Gelelektrophorese als homozygoter Tf B Typ identifiziert.
In Abb. 8 ist eine schematische Darstellung der Transferrin-Bandenmuster wiedergegeben.

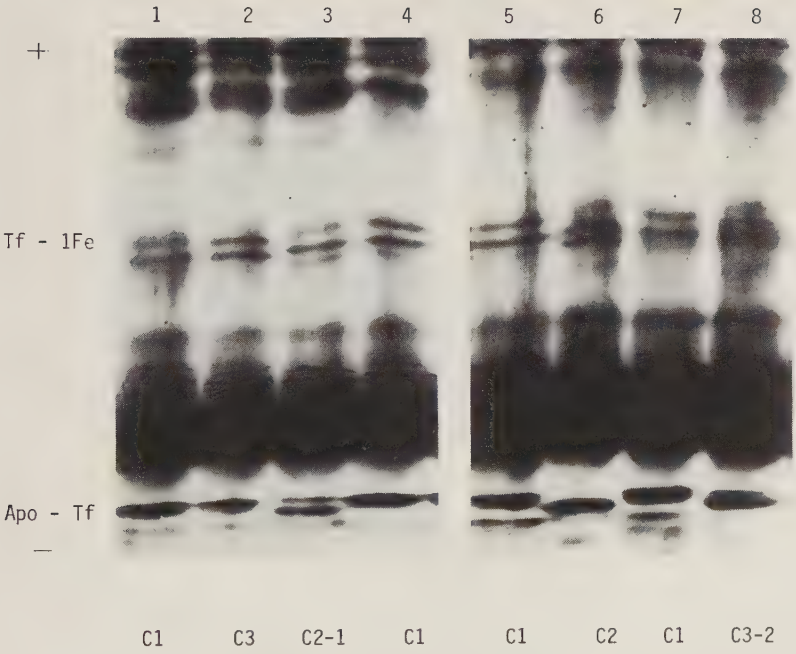


Abb. 6: Die Banden des Tf - 1Fe und des Apotransferrins nach isoelektrischer Fokussierung von Seren unterschiedlicher Typen auf Polyacrylamid-Fertiggelen pH 4,0 - 6,5 (Ausschnitt).

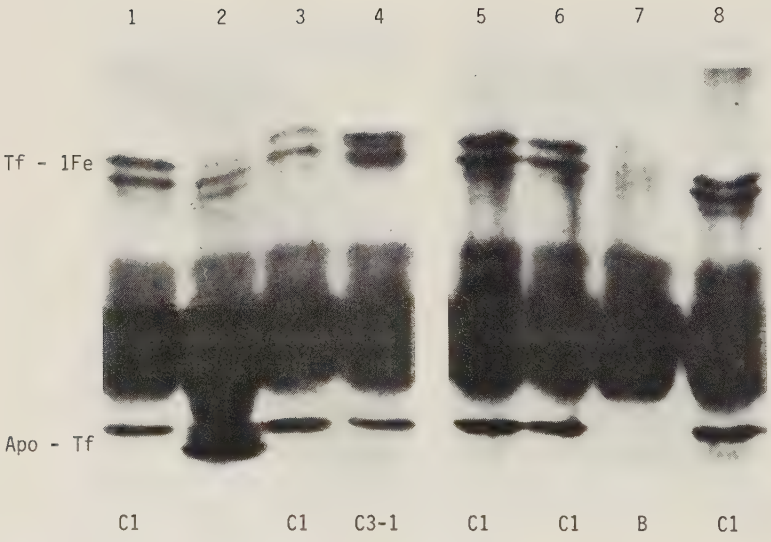


Abb. 7: Die Banden des Tf - 1Fe und des Apotransferrins nach isoelektrischer Fokussierung von Seren unterschiedlicher Typen auf Polyacrylamid-Fertiggelen pH 4,0 - 6,5 (Ausschnitt).

Bahn 2: Lipämisches Serum

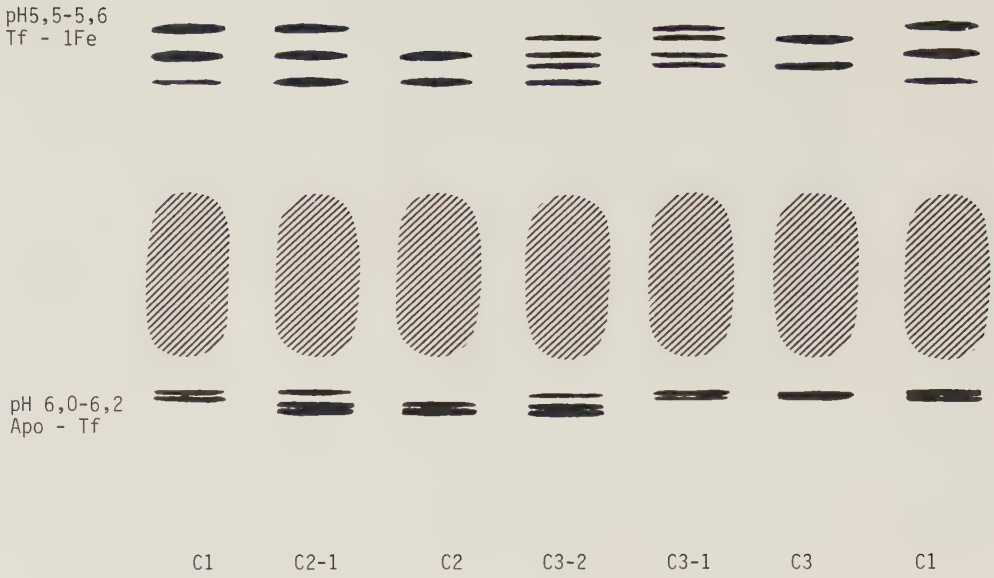


Abb. 8: Diagramm der Tf C Untergruppen nach isoelektrischer Fokussierung auf Fertiggelen pH 4,0 - 6,5 (LKB)

Einfluß von Elektrodenlösungen, Probenvolumina und Neuraminidase-Behandlung der Seren auf die Auftrennung der Transferrin-Banden

Die zunächst als Elektrodenlösung verwendeten 0,1 M ß-Alanin für die Kathode und 0,1 M Glutaminsäure + 0,5 M Phosphorsäure für die Anode brachten keine guten Fokussierungsergebnisse. Erst der Einsatz von 2%iger Ampholinelösung pH 4 - 6 für die Anode und pH 6 - 8 für die Kathode ließ scharfe, ablesbare Banden entstehen. Zu stark oder ungleichmäßig getränkte Filterstreifen für die Elektroden bewirkten eine gewellte Darstellung der Proteinbanden im Gel. Mit einer Pasteurpipette konnte eine relativ gleichmäßige Benetzung der Elektrodenstreifen vorgenommen werden.
Es wurden unterschiedliche Serum-Mengen auf Probenträgern verschiedener Größe fokussiert. 7 x 7 mm große Filterplättchen ermöglichen ein leichteres Ablesen. Die schärfsten Banden zeigten sich hier bei einem Auftrag von 7µl Serum. Auf 5x7 mm Plättchen, die mit der Langseite in Trennrichtung aufgelegt wurden, war 5 µl die optimale Menge. Bei einzelnen Proben war der Transferrin-Typ nicht nach dem ersten Lauf zu bestimmen. In einer höheren Konzentration fokussiert zeigten sich dann ablesbare Banden. Dies traf regelmäßig für Seren zu, die sich später als Tf C3-2 erwiesen.
Die zu untersuchenden Banden kamen nicht immer in die erwartete Zone des Gels zu liegen. Trotz gleichbleibender experimenteller Bedingungen mußte die optimale Position der Filterplättchen auf Fertiggelen unterschiedlicher Chargen neu ermittelt werden.
Von verschiedenen Autoren wurde durch die Behandlung der Seren mit Neuraminidase eine schärfere Bandenbildung

des Transferrins beobachtet (HAMANN, 1977; KÜHNL und SPIELMANN, 1979). Ich fokussierte EDTA-Plasma und Serum neben vorher mit Neuraminidase inkubierten Proben desselben Spenders und machte die Feststellung, daß unbehandelte Serumproben die schärfsten Banden im Tf - 1Fe Bereich um pH 5,5 - 5,6 lieferten.
Wie in Abb. 9 zu erkennen ist, wurden die Transferrinbanden von beiden EDTA-Plasma Proben auf identische Positionen im kathodischen Bereich des Gels fokussiert. Die Intensität der Banden hatte sich durch die Neuraminidase-Behandlung wohl geändert, eine Typenbestimmung konnte bei EDTA-Plasma jedoch nach wie vor nicht durchgeführt werden (vgl. Abb. 9: Bahn 1, 2, 5, 6).
Von den Serumproben, die mit Neuraminidase behandelt worden waren, fanden sich im Tf - 1Fe Bereich keine ablesbaren Banden. Die charakteristischen Banden des Apotransferrins waren dagegen gut erkennbar. Weiter kathodenwärts gelegene Banden bei pH 6,2 - 6,3 stellten sich nach Behandlung mit Neuraminidase intensiver dar, was für die Identifizierung jedoch nicht von Nutzen war.
Ein stark lipämisches getrübtes Serum bereitete Zuordnungsschwierigkeiten im Apotransferrin-Bereich (vgl. Abb. 7: Bahn 2). Ungewöhnlich starke Proteinfraktionen hatten die Transferrin-Banden in diesem pH-Bereich überdeckt, so daß eine Identifizierung, die dann nur anhand der Tf - 1Fe Banden hätte vorgenommen werden können, in diesem Falle eines fraglichen Tf C1 oder C2-1 Typs nicht möglich war. Bei der Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folie (Pufferlösung pH 8,5) wurde eine erhöhte α_2-Globulinfraktion von 1220 mg/100 ml (Normwerte 500 - 1000 mg/100 ml) festgestellt (vgl. Abb. 10). Nach RICK (1977) könnte es sich um eine Vermehrung der Prä-ß-Lipoproteine handeln, die elektrophoretisch mit den α_2-Globulinen wandern, deren isoelektrische Punkte jedoch im pH-Bereich der ß-Globuline zu liegen scheinen (WEISS, 1977).

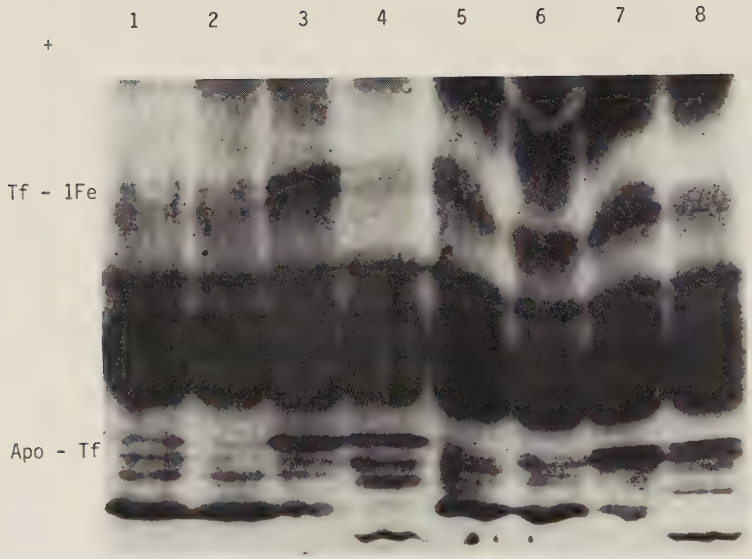
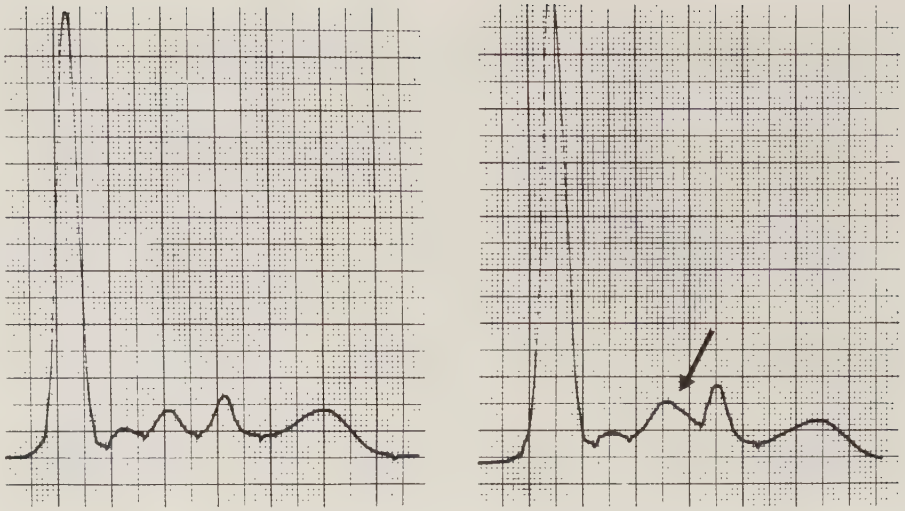


Abb. 9: Transferrin-Banden nach der isoelektrischen Fokussierung von EDTA-Plasma und Serum
1. Spender, Typ Tf C1, Bahn 1 - 4
2. Spender, Typ Tf C2-1, Bahn 5 - 8
1 und 5: EDTA-Plasma unbehandelt
2 und 6: EDTA-Plasma mit Neuraminidase behandelt
3 und 7: Serum unbehandelt
4 und 8: Serum mit Neuraminidase behandelt



a b

Abb. 10: Elektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folie

a: normales Serum

b: lipämisches Serum aus Abb. 7: Bahn 2

Der Pfeil weist auf die erhöhte α_2-Globulin-Fraktion hin.

Genfrequenzen

In Tabelle 1 sind die Genotypenfrequenzen und Genfrequenzen, die sich aus der Untersuchung von 390 Probanden ergaben, dargestellt.

Tab. 1: Die Verteilung der Genotypenfrequenzen und Genfrequenzen der Transferrin-C-Untergruppen in einer westdeutschen Bevölkerung, Großraum Düsseldorf

Phänotypen	beobachtet	erwartet	Genfrequenz
Tf C1	236	239,29	
Tf C2-1	87	81,50	
Tf C3-1	45	43,87	$Tf^{C1} = 0,7833$
Tf C3-2	7	7,47	$Tf^{C2} = 0,1334$
Tf C2	5	6,94	$Tf^{C3} = 0,0718$
Tf C3	2	2,01	$Tf^{B} = 0,0115$
Tf B	1	0,05	
Tf C1-B	7	7,03	
Tf C2-B	0	1,20	
Tf C3-B	0	0,64	
n	390	390,00	$\Sigma = 1,0000$

$\chi^2 = 0,9277$; $0,50 > p > 0,30$ (1 df)

Erwartungswerte < 10 wurden für den χ^2 - Test in zwei Gruppen zusammengefaßt.

DISKUSSION

Bisher wurden Transferrin-Banden, die sich durch isolelektrische Fokussierung von unbehandelten Seren gebildet hatten, in drei pH-Bereichen beschrieben, in denen sie sich entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte, die durch die Molekülform bestimmt werden, angelagert hatten. Dies waren die Banden des Tf - 2Fe, des Tf - 1Fe und des Apotransferrins (CONSTANS et al., 1980; HOVANESSIAN und AWDEH, 1975 und 1976; KÜHNL und SPIELMANN, 1979).
Bei der Identifizierung des im Gel fokussierten Transferrins aus unbehandeltem Serum mittels Immunfixation fiel mir eine relativ intensiv ausgeprägte vierte Reaktionsbande auf. Ihre Lage bei pH 5,9 befand sich zwischen dem Typisierungs-Bereich, gebildet von Tf - 1Fe und dem des Apotransferrins. Im gefärbten Gel wird diese Transferrin-Bande von anderen Serumproteinen überdeckt (vgl. Abb. 3a und Abb. 5: Bahn 1 und 2) und ist daher für die Untersuchung der Transferrin-C-Untergruppen nicht von Bedeutung. Sie wurde jedoch bei der Fokussierung von gereinigtem Human-Transferrin in ähnlichem pH-Bereich im gefärbten Gel gut sichtbar, da überdeckende Serumproteine hier fehlten (KÜHNL und SPIELMANN, 1979).
Nach den Untersuchungen von FLETCHER und HUEHNS (1968), LANE (1975), LESTAS (1975), MAKEY und SEAL (1976) könnte diese Bande eventuell von einer zweiten Molekülform des Tf - 1Fe gebildet worden sein.
Bei der Immunfixation von fokussiertem EDTA-Plasma wurden im Tf - 1Fe Bereich, der zur Typisierung der Transferrin-C-Untergruppen herangezogen wird, keine Reaktionszonen beobachtet (vgl. Abb. 5: Bahn 3 und 4). Dies kann auf die Eigenschaft des EDTA (Äthylendiamintetraacatat) zurückgeführt werden, mit Eisen komplexe Verbindungen einzugehen (BARKAN 1927; RICK, 1977), was sich in einer gleichzeitigen Konzentrationszunahme der Apo-

transferrin-Banden bemerkbar macht. Es war jedoch auffallend, daß eine schwache Immunfixationsbande um pH 5,9 auch bei fokussiertem EDTA-Plasma nachgewiesen werden konnte. Sollte es sich bei dieser Bande um eine zweite Molekülform des Tf - 1Fe handeln, so könnte es jene sein, die mit Eisen eine besonders feste Bindung eingeht und dieses erst bei höheren EDTA-Konzentrationen freigibt (vgl. MAKEY und SEAL, 1976).
Eine andere Ursache für die Bildung multipler Transferrin-Banden nach der isoelektrischen Fokussierung von Serum und EDTA-Plasma sind Ladungsdifferenzen im Transferrin-Molekül, die auf einer unterschiedlichen Anzahl an Sialinsäureresten beruhen. Nach Neuraminidase-Behandlung von Serum und EDTA-Plasma-Proben wurde eine Intensivierung der Transferrin-Banden im Apotransferrin-Bereich beobachtet. Eine Auswertung dieser Banden war nicht möglich. Bei der Fokussierung der inkubierten Seren kam es sogar zu einem Verlust der typischen Banden im Ablesebereich um pH 5,5 - 5,6 (vgl. Abb. 9: Bahn 4 und 8). Daher wurde die isoelektrische Fokussierung auf Polyacrylamid-Fertiggelen pH 4,0 - 6,5 (LKB) mit unbehandelten Serumproben durchgeführt.
Die unterschiedlichen Angaben in der Literatur über den pI des Transferrins und seiner Zustandsformen können sicherlich nur zum Teil mit dem unterschiedlichen Sialinsäurerest-Gehalt von Transferrin-Molekülen erklärt werden (vgl.ALTLAND et al., 1980; CONSTANS et al., 1980; HAMANN, 1977; HOVANESSIAN und AWDEH, 1976; KÜHNL und SPIELMANN, 1979; WEIDINGER et al., 1980). FREDRIKSSON (1977) wies auf die Temperaturabhängigkeit des isolelektrischen Punktes hin, der bei Messungen zwischen $4^{o}C$ - $25^{o}C$ bei einigen schwach sauren Proteinen um 0,2 pH Einheiten differieren kann. Bei Routineuntersuchungen bekannter Phänotypen ist der absolute pI Wert jedoch von geringerer Bedeutung, solange eine Angabe von pI Bereichen zur Typenbestimmung und zum Vergleich mit den Untersuchungen anderer Autoren ausreicht.

Die Tatsache, daß bei einzelnen Probanden die erste Untersuchung keine ablesbaren Transferrin-Banden entstehen ließ, machte eine Fokussierung mit unterschiedlichen Serummengen in einzelnen Fällen notwendig. Dies kann einmal darauf zurückgeführt werden, daß individuell unterschiedliche Serum-Transferrin-Konzentrationen vorkommen. Außerdem werden tageszeitliche Schwankungen des Serumeisenspiegels beobachtet mit einem Höhepunkt in den Morgenstunden. Dies und eine von Spender zu Spender unterschiedliche Eisensättigung wirkten sich als Schwankungen der Tf - 1Fe Menge aus. Eine Behandlung der Seren mit Fe^{3+} vor der Fokussierung ist daher ratsam.
Sind auch nach wiederholter Fokussierung mit höheren Serummengen keine Transferrin-Banden nachzuweisen, kann es sich um Tf B oder Tf D Varianten handeln, die auf den Fertiggelen pH 4,0 - 6,5 (LKB) nicht identifiziert werden konnten. Daher ist eine Überprüfung aller sich homozygot darstellender Transferrin-Typen mittels der üblichen Elektrophorese notwendig, um seltenere Varianten zu erkennen.
Eine neue Methode, mit deren Hilfe selektiv Proteine auf ihren Polymorphismus hin untersucht werden können, stellte ALTLAND (1980) vor. Er beschrieb die Kombination von Elektrophorese mit isoelektrischer Fokussierung, wobei zunächst mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese Serum in einzelne Proteinfraktionen aufgetrennt wurde. Zur weiteren Untersuchung wurde dem Elektrophorese-Gel der Transferrin-Bereich als Gelstreifen entnommen, auf ein vorfokussiertes Polyacrylamid-Gel aufgelegt und dort fokussiert. Auf diese Weise zeigte ALTLAND Tf C, Tf B und Tf D Varianten fast ohne Beimengungen anderer störender Serumproteine.
WEIDINGER veröffentlichte 1980 ebenfalls eine Arbeit über den Transferrin Polymorphismus. Der Nachweis von Tf C und Tf D Varianten war im Apotransferrin Bereich (bei pH 5,9) im gefärbten Gel gut möglich. Die Tf - 1Fe Banden (um pH 5,4)

wurden durch Eisenzusatz zum Serum deutlich und konnten zur Identifizierung der Transferrin-C-Untergruppen herangezogen werden. Die Tf B Varianten konnten nur mit Hilfe der Immunfixation nachgewiesen werden, da die Banden im gefärbten Polyacrylamid-Gel pH 4,0 - 6,5 (LKB) von anderen Serumproteinen überdeckt worden waren.
Ein Vergleich der vorliegenden Arbeit mit anderen Untersuchungen (Tab. 2a und 2b) zeigt bei den Genfrequenzen nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen. Die relativ niedrigen Frequenzen für Tf^{C3}, die KÖHNL und SPIELMANN (1979) und CONSTANS et al. (1980) in ihren Untersuchungen ermittelt hatten, sind möglicherweise zufallsbedingt und könnten durch das verhältnismäßig kleine Probandenkollektiv erklärt werden. Berücksichtigt man, daß die Untergruppe Tf^{C3} aus einer Aufspaltung des ursprünglichen Tf^{C1} Allels in Tf^{C1} und Tf^{C3} hervorgegangen ist (KÖHNL und SPIELMANN, 1979; WEIDINGER et al., 1980), so sind die Unterschiede in den Genfrequenzen für Tf^{C1} sehr gering:

KÖHNL und SPIELMANN, 1979	0,837
WEIDINGER et al., 1980	0,8478
ALTLAND et al., 1980	0,822
CONSTANS et al., 1980	0,841
die vorliegende Untersuchung	0,8551

Auffallend ist der Unterschied in den Genfrequenzen für Tf^{C2}. HOSTE (1979) fand in Belgien eine Frequenz von 0,206, während CONSTANS et al. (1980) in den Pyrenäen eine Frequenz von 0,132 ermittelten. Hier könnten populationsgenetische Faktoren eine Rolle spielen.
Die in der vorliegenden Arbeit errechnete Frequenz für Tf^{C2} = 0,1334 ist verhältnismäßig niedrig im Vergleich zu anderen Untersuchungen in der Bundesrepublik.
Die untersuchte Population unterliegt anscheinend Hardy-Weinberg-Bedingungen (χ^2 = 0,9277, df = 1, vgl. Tab. 1).
CONSTANS et al. (1980) beobachteten zwei neue Transferrin-C-Untergruppen: bei Indianern in Nord Amerika, Bolivien und Brasilien das Tf C4 und bei schwarzen Amerikanern das Tf C5.

Tab. 2 a Genfrequenzen verschiedener Untersucher für das Transferrin-System unter Berücksichtigung der Tf^C-Untergruppen (Tf^{C1}, Tf^{C2}, Tf^{C3}, Tf^{C4}, Tf^{C5})

Untersucher	Genfrequenzen										
	n	Tf^{C1}	Tf^{C2}	Tf^{C3}	Tf^{C4}	Tf^{C5}	Tf^{B1}	Tf^{B2}	Tf^{B1-2}	insgesamt Tf^B	Tf^{D1}
KÖHNL u. SPIELMANN 1979 BRD, Hessen	252	0,795	0,155	0,042				0,008			
WEIDINGER et al. 1980 BRD, München	184	0,7772	0,1468	0,0706				0,0027	0,0027		
ALTLAND et al. 1980* BRD, Baden-Württemberg	352	0,75	0,165	0,072			0,006	0,0014			0,0014
CONSTANS et al. 1980 Frankreich, Pyrenäen	250	0,788	0,132	0,053	(0,03-0,04) Bolivien, Indianide	(0,01-0,02) U.S.A. Negride		0,027			
diese Arbeit 1981 BRD, Düsseldorf	390	0,7833	0,1334	0,0718						0,0115	

*Die Genfrequenzen, die der Original-Publikation entnommen sind, addieren sich nicht zu 1.

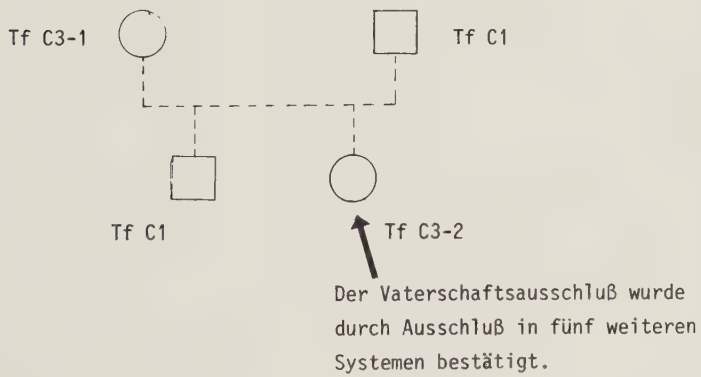
Tab. 2 b

Genfrequenzen verschiedener Untersucher für das Transferrin-System unter Berücksichtigung der Tf^C-Untergruppen Tf^{C1} und Tf^{C2}.
Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Vergleich umgerechnet.

Untersucher	Genfrequenzen							
	n	Tf^{C1}	Tf^{C2}	Tf^{B2}	Tf^{B1-2}	insgesamt Tf^B	Tf^D	Seltene Gene
KÖHNL u. SPIELMANN 1978 BRD, Hessen	942	0,8195	0,1720	0,0064	0,0016		0,0005	
THYMANN 1978 Dänemark, Kopenhagen	132	0,8144	0,1856					
HOSTE 1979 Belgien, Lüttich	253	0,784	0,206			0,007	0,003	
STIBLER Stockholm	100	0,905	0,090					0,005
1979 Umeå	100	0,840	0,155					0,005
Schweden Lappen	100	0,830	0,165					0,005
diese Arbeit 1981 BRD, Düsseldorf	390	0,8551	0,1334			0,0115		

Nachdem einerseits der Erbgang geklärt ist, andererseits die Transferrin-C-Varianten nach isoelektrischer Fokussierung in Fertiggelplatten identifiziert werden konnten, wurden bei einzelnen Vaterschaftsuntersuchungen auch die Transferrin-Untergruppen bestimmt. Bis zur Entdeckung des Tf-C-Polymorphismus durch KÖHNL und SPIELMANN schien die isolierte Untersuchung der Transferrin-Varianten zur Klärung forensischer Fragestellungen wenig sinnvoll zu sein (vgl. BUNDSCHUH et al. 1968). Bei Berücksichtigung der Varianten Tf C1 und Tf C2 errechnete THYMANN (1978) einen Anstieg der theoretischen Ausschlußwahrscheinlichkeit bei Vaterschaftsprozessen von 1 auf 13 % bzw. von 1 auf 14,9 % (HOSTE,1979). Unter Einbeziehung des Allels Tf C3 errechneten WEIDINGER et al. (1980) bei einer Untersuchung von 450 süddeutschen Probanden eine theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit von 18,66 % allein für das Transferrin-System.
In einem Gutachtenfall fand sich ein Ausschluß bei den Transferrin-Untergruppen, der durch Ausschlußkonstellationen in fünf weiteren Systemen bestätigt wurde.

Abb. 11: Vaterschaftsausschluß in Transferrin-C-Untergruppen



ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Transferrin-C-Untergruppen im Düsseldorfer Raum mittels isoelektrischer Fokussierung untersucht. Dabei konnten folgende Genfrequenzen beobachtet werden: Tf^{C1} = 0,7833, Tf^{C2} = 0,1334, Tf^{C3} = 0,0718 und Tf^{B} = 0,0115. Die Genfrequenzen lagen im Bereich der von anderen Untersuchern in Deutschland festgestellten Werte. Die untersuchte Population unterliegt anscheinend HARDY-WEINBERG-Bedingungen. Tf^{B} konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, hierzu wurde die übliche Elektrophorese angewandt.

LITERATUR

AISEN, P., R. AASA, Bo G. MALMSTRÖM and T. VÄNNGARD:
Bicarbonate and the binding of iron to transferrin.
J. Biol. Chem. 242 (1967) 2484-2490

AISEN, P., R. AASA, and A. G. REDFIELD:
The chromium, manganese and cobalt complexes of transferrin. J. Biol. Chem. 244 (1969) 4628-4633

AISEN, P.: The binding and release of iron by transferrin.
In: A. Cerami, C. M. Peterson and J. H. Granziano (eds.): Iron metabolism and thalassemia. Birth Defects: Original Art. Ser. XII/8 (1976) 81-95

ALTLAND, K., R. HACKLER, and W. KNOCHE:
Double-one-dimensional electrophoresis of human serum transferrin: A new high-resolution screening method for genetically determined variation. Hum. Genet. 54 (1980) 221-231

BARKAN, G.: Die Verteilung des leicht abspaltbaren Eisens zwischen Blutkörperchen und Plasma und sein Verhalten unter experimentellen Bedingungen (Eisenstudien, 3. Mitteilung) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 171 (1927) 194-221

BUNDSCHUH, G., G. GESERICK und M. ROSE: Die Verteilung der humanen Transferrinvarianten im Raum Berlin.
Fol. Haematol. 90 (1968) 422-428

CHARLWOOD, P.A.: Differential sedimentation-velocity and gel-filtration measurements on human apotransferrin and iron-transferrin. Biochem. J. 125 (1971) 1019-1026

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.: Probable assignment of the serum cholinesterase (E_1) and transferrin (Tf) loci to chromosom 1 in man. Hum. Hered. 27 (1977) 134-142

CONSTANS, J., P. KÜHNL, M. VIAU and W. SPIELMANN: A new procedure for the determination of transferrin^C (Tf^C) subtypes by isoelectric focusing. Existence of two additional alleles, Tf^{C4} and Tf^{C5}. Hum. Genet. 55 (1980) 111-114

CORCORAN, P.A., J. WEINER, E.M. VITAGLIANO, E. M. HOAGLAND, E. R. HOLBROOK, J. R. KELLER, H. E. MOULTON, and L. K. DIAMOND: Linkage study of gamma globulin groups. Vox Sang. (Basel) 11 (1966) 620-622

CROW, J. F. and KIMURA, M.: An introduction to population genetics theory. Harper & Row, Publ., New York, Evanston, London 1970, 34-39 und 493-500

DRIESEL, A. J., H.-G. SCHEIL, I. M. PFEIFFER and G. RÖHRBORN: Gene frequencies of transferrin (Tf^C) subtypes in Western Germany (Düsseldorf region) Z. Rechtsmed. 86 (1981) 133-135

FAWCETT, J. S.: The pH drift during isoelectric focusing, a comparison between different techniques. In: Righetti P. G.: Progress in isoelectric focusing and isotachophoresis, North-Holland Publ. Comp. 1975, 25-37

FERRELL, R. E., N. UEDA, C. SATOH, R. J. TANIS, J. V. NEEL, H. B. HAMILTON, T. INAMIZU, and K. BABA: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. I. Albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, and transferrin. Ann. Hum. Genet. 40 (1977) 407-418

FLETCHER, J. and E. R. HUEHNS: Function of transferrin. Nature (Lond.), 218 (1968) 1211-1214

FREDRIKSSON, S.: On the temperature dependence of isoelectric points of proteins with special reference to isoelectric focusing. In: Radola, B. J. and D. Graesslin: Electrofocusing and isotachophoresis. De Gruyter, Berlin, New York 1977, 71-83

GOYA, N., SUMIO MIYAZAKI, SABURO KODATE and BUNICHI USHIO: A family of congenital atransferrinemia. Blood 40 (1972) 239-245

HAMANN, A.: Microheterogeneity of serum glycoproteins as revealed by flat-bed gel isoelectric focusing. In: Radola, B. J. and D. Graesslin: Electrofocusing and isotachophoresis. De Gruyter, Berlin, New York 1977, 329-336

HEILMEYER, L., W. KELLER, O. VIVELL, W. KEIDERLING, K. BETKE, F. WÖHLER und H. E. SCHULTZE: Kongenitale Atransferrinämie bei einem sieben Jahre alten Kind. Dtsch. Med. Wochenschr. 86 (1961) 1745-1751

VAN DER HEUL, C., H. G. VAN EIJK, W. F. WILTINK and B. LEIJNSE: The binding of iron to transferrin and the other serum components at different degress of saturation with iron. Clin. Chim. Acta 38 (1972) 347-353

HOPKINS, L. L., and K. SCHWARZ: Chromium (III) binding to serum proteins, specifically siderophilin. Biochim. Biophys. Acta 90 (1964) 484-491

HOSTE, B.: Group-specific component (Gc) and transferrin (Tf) subtypes ascertained by isoelectric focusing. Hum. Genet. 50 (1979) 75-79

HOVANESSIAN, A. G. and Z. L. AWDEH: Gel isoelectric focusing of human-serum transferrin. Eur. J. Biochem. 68 (1976) 333-338

JONES, H. D. C., and D. J. PERKINS: Metal-ion binding of human transferrin. Biochim. Biophys. Acta 100 (1965) 122-127

KIRK, R. L.: The distribution of genetic markers in Australian aborigines. Occasional papers in aboriginal studies 4, Australian Institute of Aboriginal Studies Canberra, 1965

KOLIN, A.: An electromagnetokinetic phenomenon involving migration of neutral particles. Science 117 (1953) 134-137

KOLIN, A.: Isoelectric spectra and mobility spectra: A new approach to elektrophoretic separation. Nat. Acad. Sci. 41 (1955) 101-110

KÜHNL, P. and W. SPIELMANN: Transferrin: Evidence for two commen subtypes of the Tf^C allele. Hum. Genet. 43 (1978) 91-95

KÖHNL, P.: Arbeitsanleitung zur Bestimmung einiger Serumprotein- und Enzympolymorphismen durch Elektrofokussierung. LKB Instrument GmbH, H. Perlmutter und B. Wallenborg, Applikationslaboratorium LKB-Produkter AB, S- 16125 Bromma/Schweden, 1979

KÖHNL, P. and W. SPIELMANN: A third common allele in the transferrin system, Tf^{C3}, detected by isoelectric focusing. Hum. Genet. 50 (1979) 193-198

LANE, R.S.: Differences between hum.Fe_1-transferrin molecules. Brit. J. Haematol. 29 (1975) 511-520

LAURELL, C. B.: Plasma iron and the transport of iron in the organism. Pharmacol. Rev. 4 (1952) 371-395

LESTAS, A. N.: The effect of pH upon human transferrin: Selective labelling of the two iron-binding sites. Brit. J. Haematol. 32 (1976) 341-350

LUK, CHUN KA: Study of the nature of the metal-binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions as fluorescent probes. Biochem. 10 (1971) 2838-2843

MAKEY, D. G. and U. S. SEAL: The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. Biochim. Biophys. Acta 453 (1976) 250-256

MANN, K. G., W. W. FISH, A. CHADWICK COX, and C. TANFORD: Single-chain nature of human serum transferrin. Biochem. 9 (1970) 1348-1354

McKUSICK, V. A.: Mendelian inheritance in man. John Hopkins Univers. Press Baltimore, London, 1978, 5. Aufl.

MOURANT, A. E., A. C. KOPEČ, and K. DOMANIEWSKA-SOBCZAK: The distribution of human blood groups and other polymorphisms. Oxford Univ. Press, London, New York Toronto 1976, 2. Aufl. 672-685

MUELLER, J. O., O. SMITHIES, and M. R. IRWIN: Transferrin variation in columbidae. Genet. 47 (1962) 1385-1392

PARKER, W. C. and A. G. BEARN: Studies on the transferrins of adult serum, cord serum, and cerebrospinal fluid. J. Exp. Med. 115 (1962) 83-105

PICTON, H. and S. E. LINDNER: Solution and pseudosolution. Part III. The electrical convection of certain dissolved substances. J. Chem. Soc. London 71 (1897) 568-573

POULIK, M. D.: Tests of purity of diphtheria toxins by electrophoresis in starch gel. Nature (Lond.) 177 (1956) 982-983

POULIK, M. D.: Interaction of transferrin, haptoglobin and other serum proteins with neuraminidase of diphtheria toxin. Clin. Chim. Acta 6 (1961) 493-502

PROCHNICKA, B.: The transferrin group system in the Polish population. Acta Med. Polon. 9 (1968) 263-279

RICK, W.: Klinische Chemie und Mikroskopie. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1977, 5. Aufl. 203-205

SCHEIL, H.-G.: Protein-Mapping von menschlichen Seren. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11 (1973) 456-458

SCHULTZE, H. E., K. HEIDE und H. MÜLLER: Über Transferrin/Siderophilin. Behringwerk Mitt. 32 (1957) 25-48

SEPPÄLA, M., E. RUOSLAHTI, and O. MÄKELÄ: Inheritance and genetic linkage of Gc and Tf groups. Acta Genet. 17 (1967) 47 - 54

SMITHIES, O.: Variations in human serum β-globulins. Nature (Lond.) 180 (1957) 1482-1483

SMITHIES, O. and O. HILLER: The genetic control of transferrins in humans. Biochem. J. 72 (1959) 121-126

SPEYER, B. and J. FIELDING: Chromatographic fractionation of human reticulocytes after uptake of double labelled (^{59}Fe, ^{125}I) transferrin. Biochim. Biophys. Acta 332 (1974) 192-200

STIBLER, H., G. BECKMANN, and C. SIKSTRÖM: Subtypes of transferrin C^1. Hum. Hered. 29 (1979) 320-324

SVENSSON, H.: Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The different equation of solute concentrations at a steady state and a solution for simple cases. Acta Chem. Scand. 15 (1961) 325-341

SVENSSON, H.: Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. III. Description of apparatus for electrolysis in columns stabilized by density gradients and direct determination of isoelectric points. Arch. Biochem. Biophys, Suppl. 1 (1962) 132-138

TAN, A.-T.: Circular dichroism properties of conalbumin and its iron and copper complexes. Can. J. Biochem. 49 (1971) 1071-1075

THYMANN, M.: Identification of a new serum protein polymorphism as transferrin. Hum. Genet. 43 (1978) 225-229

TISELIUS, A.: Stationary electrolysis of ampholyte solutions. Svensk Kem. Tidskr. 53 (1941) 305-310

TUTTLE, A. H.: The separation and identification of human hemoglobins by "isoelectric line spectra" formation. J. Lab. Clin. Med. 47 (1956) 811-816

UMANSKY, I., J. REID, P. A. CORCORAN, D. BOLLING, J. H. RENWICK, C. F. A. MOORREES, and F. H. ALLEN jr.: Genetics of blood groups. Linkage analysis of 207 pedigrees. Vox Sang. (Basel) 11 (1966) 450-459

VESTERBERG, O.: LKB-Produkter AB, Swedish Patent Application 10273, 8. August 1964

VESTERBERG, O., T. WADSTROM, K. VESTERBERG, H. SVENSSON, and B. MALMGREN: Studies on extracellular proteins from Staphylococcus aureus. I. Separation and characterization of enzymes and toxins by isoelectric focusing. Biochim. Biophys. Acta 133 (1967) 435-445

WANG, AN-CHUAN, H. ELDON SUTTON, and P. N. HOWARD: Human transferrins C and D_{Chi}: An amino acid difference. Biochem. Genet. 1 (1967) 55-59

WEIDINGER, S., F. SCHWARZFISCHER, and H. CLEVE: Classification of transferrin (Tf) subtypes by isoelectric focusing. Z. Rechtsmed. 85 (1980) 255-261

WEISS, Ch.: Funktion des Blutes. In: R. F. Schmidt und G. Thews: Physiologie des Menschen. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1977, 19. Aufl. 318-345

WILLIAMS, R. R. and R. E. WATERMAN: Electrodialysis as a means of characterizing ampholytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 27 (1929) 56-65

WONG, K. L., M. T. DEBANNE, M. W. C. HATTON and E. REGOECZI: Humantransferrin asialotransferrin and the intermediate forms. Can. Int. J. Pept. Protein Res. 12 (1978) 27-37

WRIGLEY, C. W.: Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing. J. Chromat. 36 (1968) 362-365

REAGENZIEN

Acrylamid zur Synthese
Merck-Schuchardt 800830

Amidoschwarz 10 B
Merck, Darmstadt 20470

Ammoniumperoxodisulfat zur Analyse
Merck, Darmstadt 1201

Ampholine-Lösung 40 %
LKB Bromma, Schweden

Ampholine PAGplates pH 4,0 - 6,5
LKB Bromma, Schweden

Antiserum gegen Humantransferrin von Kaninchen
Behringwerke, Marburg ORCF 04

Coomassie Brilliant Blue R-250
Serva, Heidelberg 17525

Bisacrylamid (N,N'-Methylendiacrylamid)
Merck-Schuchardt 805968

Essigsäure reinst
Merck, Darmstadt 58

Filterplättchen aus
Dünnschicht Elektrophorese Papierbrücken
185/50 mm
Desaga, Heidelberg 121231

Hydroxylaminhydrochlorid
Merck, Darmstadt 4616

Membran Filter (Cellulose-Acetat-Folie)
Sartorius 50 K, Typ 11200

Methanol reinst
Merck, Darmstadt 6008

Natriumacetat
Merck, Darmstadt 6267

Natriumsulfit wasserfrei zur Analyse
Merck, Darmstadt 6657

Neuraminidase aus Vibrio comma (cholera)
Behringwerke, Marburg ORKD 04

Nitroso R-Salz
Merck, Darmstadt 6809

Saccharose
Merck, Darmstadt 7651

5-Sulfosalicylsäure
Merck, Darmstadt 691

TMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthyläthylendiamin)
Serva, Heidelberg 35925

Anhang zu Abb. 1a

Die geographische Verteilung der Häufigkeit des Gens Tf^D.
(Genfrequenzen nach Mourant, 1976)

Europa, Schweden, Norbotten (Lappen)	0,0091
Finnland, Lappi (Finnen)	0,0280
U.S.S.R., Kol'sky Peninsula (Lappen)	0,0189
U.S.S.R., Sibirien (Buryat)	0,0120
Süd-West-Asien, Iran, Fars (Ghashghai)	0,0256
Indien, Bhutan	0,0099
Ceylon, Ginindamana, Dalikana (Veddah)	0,0625
Süd-Ost-Asien, Cambodia, Pnom-Penh (Khmer)	0,0497
Laos, Central und Süd	0,0490
Vietnam, Saigon	0,0411
Vietnamesen in Frankreich (Paris)	0,0174
Philippinische Inseln	0,0106
Java, Djakarta (Chinesen)	0,0294
Malaya, Kuala Lumpur (Chinesen)	0,0222
China, Hong Kong (Chinesen)	0,0533
Taiwan (Chinesen)	0,0550
Japan, Hokkaidu, Niikappu (Ainu)	0,0294
Japan, Honshu, Osaka (Japaner)	0,0073
Afrika, Liberia	0,0196
Nigeria, Katsina (Habe)	0,0750
Senegal (Serere)	0,0389
Sudan (Beja)	0,0101
Botswana, Kalahari (Bantu)	0,0556
Burundi (Hutu und Tutsi)	0,0434
Central Afrikan. Republik (Babinga Pygmäen)	0,1375
Kongo (Kongolesen)	0,0408
Kenya, Nairobi (Bantu, Nilotic)	0,0379
Madagascar (Malagasy)	0,0629
Südafrikan. Republik, Johannesburg (Msutu)	0,0459
Tanzania (Bondei)	0,0417

Anhang zu Abb. 1a

Die geographische Verteilung der Häufigkeit des Gens Tf^D.
(Genfrequenzen nach Mourant, 1976)

Amerika, U.S.A., New York City (Chinesen)	0,0550
Amerika, U.S.A., Georgia (Schwarze)	0,0489
Britisch Honduras, San Antonio (Maya)	0,0425
Costa Rica, Curres (Boruca)	0,1111
Guatemala (Kekchi)	0,0278
Honduras (Paya)	0,0662
Mexico (Chiapaneca)	0,0213
Nicaragua, Bilwas, Saupuka (Miskito)	0,0463
Panama, Almirante (Guayami, Cricamola)	0,0588
Süd-Amerika, Brasilien, Santa Catarina (Awaikoma)	0,0061
Kolumbien, Tierradentro (Paez)	0,0243
Ecuador, Plateau (Quechua)	0,0703
Franz. Guayana (Galibi)	0,1503
Franz. Guayana (Boni, reine Afrikaner)	0,1859
Peru (Piro)	0,0174
Surinam (Schwarze)	0,0753
Venezuela, Amazonas (Piaroa)	0,1948
Australien, Süd-Australien (Yalata)	0,3237
Nord-Territorium, Elcho Island (Malag)	0,1700
Melanesien - Bismarck Archipel, New Britain (Arawe)	0,1538
Neu Guinea (Auiyana)	0,1434
Neue Hebriden	0,0226
Caroline Islands	0,0091

Anhang zu Abb. 1b

Die geographische Verteilung der Häufigkeit des Gens Tf^B.
(Genfrequenzen nach Mourant, 1976)

Europa, Israel, Juden (Süd Yemen)	0,0025
Finnland, Lappi (Finn-Lappen)	0,0079
Finnland, Aland Inseln (Familienuntersuchung)	0,0123
Frankreich, Süden (Soldaten)	0,0116
Deutschland, Hessen	0,0060
Griechenland, Rhodos	0,0029
Nord-Irland	0,0126
Italien, Puglia, Lecce	0,0070
Italiener in Mexico, 1882 ausgewandert	0,0172
Polen	0,0156
Süd-West-Asien, Iran, Shiraz	0,0035
Süd-Ost-Asien, Vietnam, Franco-Vietnamesen	0,0051
Japan, Yamaguchi Prefectur, Ube, Japaner	0,0109
Afrika, Liberia	0,0096
Kongo (Basakata und Nkundu)	0,0059
Kenya (Bantu, Nilotic)	0,0082
Amerika, U.S.A. Neu-Mexico (Zuni)	0,0986
U.S.A., Michigan (Weiße europ. Ursprungs)	0,0054
Britisch Honduras (Kekchi)	0,0077
Guatemala (Quiche Maya)	0,0053
Mexico (Lacandon)	0,0847
Nicaragua (Miskito)	0,0031
Argentinien (Araucano, Mapuche)	0,0121
Brasilien, Rio Grande do Sul (Caingang)	0,0043
Franz.-Guayana (Roucouyenne)	0,0421
Australien, Queensland	0,0108
Melanesien, New Britain (Baining)	0,0185
Neu Guinea, Markham River Valley (Bukawa)	0,0179
Neue Hebriden	0,0050
Cook Inseln	0,0051
Hawaii Inseln (Weiße)	0,0025

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. R ö h r b o r n danke ich für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Herrn Dr. H.-G. S c h e i l und Herrn Dr. A.J. D r i e s e l gilt mein besonderer Dank für ihre anregende Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. H.T. B r ü s t e r,
Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Untersuchungsmaterials danken.

Herrn Prof. Dr. P. K ü h n l,
Institut für Immunhämatologie der Universität Frankfurt/Main, bin ich sehr dankbar für die Überprüfung einzelner Transferrin-C-Untergruppen.

Frau A. G ü n t h e r, Frau M. L o v r e n c i c und Frau M. M e i n e c k,
tätig am hiesigen Institut, möchte ich herzlich für ihre technischen Hilfen danken.

LEBENSLAUF

Name:	Inge Marie Liese Pfeiffer geb. Krawehl
Geboren am:	19.06.1938 in Essen
Eltern:	Hans Krawehl, Kaufmann Anneliese Krawehl, geb. Witte
Geschwister:	zwei jüngere Schwestern zwei jüngere Brüder
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	evangelisch
Stand:	verheiratet seit 1962 mit Herrn Dr. Ing. Gerd Pfeiffer eine Tochter, geb. 1966 ein Sohn, geb. 1969
Schulbildung:	1944 bis 1949 Volksschule 1949 bis 1958 Neusprachliches Mädchen-gymnasium und Frauenoberschule Maria-Wächtler Schule, Essen März 1958 Abitur April bis September 1958 École Lêmania, CH - Lausanne Abschluß: Diplôme de la Langue Francaise
Lehre:	Oktober 1958 bis März 1959 Staatl. Handels- und Gewerbeschule, Rheydt April 1959 bis März 1960 Schneiderlehre im Modeatelier Thiele-Förster, Düsseldorf Abschluß: Gesellenbrief für das Damen-schneider-Handwerk

Berufsbildung:	April 1960 bis März 1962 Modeschule Düsseldorf Abschluß: Diplom der Modeschule Düsseldorf
	Mai bis Oktober 1962 Directricen-Assistentin bei der Fa. Karin Büche, Nürnberg
	März 1963 bis März 1967 Aushilfslehrerin an städtischen Grundschulen in Essen und Mülheim
	März 1967 bis März 1977 Hausfrau
Studium:	Seit SS 1977 Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf März 1979 ärztliche Vorprüfung März 1980 erster Teil der ärztlichen Prüfung seit August 1979 Bearbeitung des Dissertationsthemas